

**Knoblauch im Pflanzenschutz –  
Wirkung, Anwendungsmöglichkeiten und molekularbiologische Studien  
unter besonderer Berücksichtigung des Inhaltsstoffes Allicin**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Daniela Portz

aus Bonn

Berichter: Prof. Alan J. Slusarenko, Ph.D.  
Priv.-Doz. Dr. Ulrich Schaffrath

Tag der mündlichen Prüfung: 05. März 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden unter den folgenden Titeln veröffentlicht.

PORTZ, D.; NOLL, U.; SLUSARENKO, A.J. (2005) Allicin from garlic (*Allium sativum* L.): A new look at an old story. In: Dehne, H.W.; Gisi, U.; Kuck, K.H.; Russell, P.E.; Lyr, H. (Eds.), *Proc. of the 14th Intern. Reinhardsbrunn Symposium, Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, Alton, UK: British Crop Production Council, 227-234

PORTZ, D.; KOCH, E.; SLUSARENKO, A.J. (2008) Effects of garlic (*Allium sativum* L.) juice containing allicin on *Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) and on downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev. *Eur. J. Plant Pathol.* (in press)

SLUSARENKO, A.J.; PATEL, A.; PORTZ, D. (2008) Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur. J. Plant Pathol.* (in press)

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 KNOBLAUCH UND ALLICIN.....	3
1.2 PHYTOPATHOGENE UND PATHOSYSTEME .....	6
1.2.1 <i>Phytophthora infestans</i> .....	6
1.2.2 <i>Alternaria spp.</i> .....	8
1.3 DIE APOPTOSE .....	10
1.3.1 <i>Apoptose in Hefe</i> .....	13
1.4 PROTEIN-TRANSPORTWEGE IN PFLANZENZELLEN .....	13
1.4.1 <i>Methoden für Lokalisationsstudien</i> .....	17
1.5 ZUSAMMENFASSENDE ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	19
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
2.1 CHEMIKALIEN.....	20
2.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	23
2.3 KITS UND ENZYME .....	26
2.4 GRÖßENMARKER .....	27
2.5 MIKROORGANISMEN.....	28
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	28
2.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
2.5.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
2.5.4 <i>Phytophthora infestans</i> .....	29
2.5.5 <i>Alternaria solani</i> .....	29
2.6 PFLANZENMATERIAL .....	29
2.6.1 <i>Tomatenpflanzen</i> .....	29
2.6.2 <i>Arabidopsis-Pflanzen</i> .....	29
2.6.3 <i>Tabakpflanzen</i> .....	30
2.7 NUKLEINSÄUREN.....	30
2.7.1 <i>Vektoren</i> .....	30
2.7.2 <i>Oligonukleotide</i> .....	31
2.8 MEDIEN .....	31
2.8.1 <i>Bakterien-Medien</i> .....	32
2.8.2 <i>Hefe-Medien</i> .....	32
2.8.3 <i>Pilz- bzw. Oomyceten-Medien</i> .....	33
2.8.4 <i>Pflanzen-Medien</i> .....	33
2.9 LÖSUNGEN UND PUFFER .....	33
2.9.1 <i>Für die Glutathion-Messung</i> .....	33
2.9.2 <i>Für die RNA-Extraktion</i> .....	34

2.9.3	<i>Für die DNA-Extraktion</i> .....	34
2.9.4	<i>Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen</i> .....	34
2.9.5	<i>Für die Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	35
2.9.6	<i>Zur Transformation von A. thaliana</i> .....	35
2.9.7	<i>Zur Transformation von Tabak-Protoplasten</i> .....	35
2.9.8	<i>Für die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	36
2.9.9	<i>Für die Northern Blot Analyse</i> .....	37
2.9.10	<i>Zur Proteinextraktion</i> .....	37
2.9.11	<i>Für die Proteinmengenbestimmung nach LOWRY et al.</i> .....	38
2.9.12	<i>Für die Western Blot Analyse</i> .....	38
2.9.13	<i>Zur Bestimmung der <math>\alpha</math>-Amylase-Aktivität</i> .....	39
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>40</b>
3.1	HERSTELLUNG DES KNOBLAUCHSAFTES.....	40
3.2	ANALYSEMETHODEN.....	40
3.2.1	<i>Bioassay</i> .....	40
3.2.2	<i>HPLC</i> .....	40
3.3	PFLANZENANZUCHT.....	42
3.3.1	<i>Tomaten für Versuche mit Phytophthora infestans und Alternaria solani</i> .....	42
3.3.2	<i>Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) für die stabile Transformation</i> .....	42
3.3.2.1	<i>Anzucht auf Erde</i> .....	42
3.3.2.2	<i>Sterile Anzucht und Selektion transgener Pflanzen</i> .....	42
3.3.3	<i>Tabak für die Protoplastengewinnung</i> .....	43
3.4	PATHOGENKULTIVIERUNG / -ERHALTUNG.....	43
3.4.1	<i>Phytophthora infestans (Mont.) de Bary</i> .....	43
3.4.2	<i>Alternaria solani</i> .....	43
3.5	PATHOGEN-VERSUCHE.....	44
3.5.1	<i>Klimakammer-Versuche</i> .....	44
3.5.1.1	<i>Phytophthora infestans an Tomate</i> .....	44
3.5.1.2	<i>Alternaria solani an Tomate</i> .....	44
3.5.2	<i>Freilandversuch</i> .....	45
3.5.3	<i>Versuche mit Alternaria-infizierten Karottensamen</i> .....	45
3.5.3.1	<i>Einbindung des Knoblauchs in ein „Seed-Priming“-Verfahren für Saatgut</i> .....	46
3.5.3.2	<i>Überprüfung der Lagerfähigkeit behandelter Karottensamen</i> .....	46
3.6	PHYTOTOXIZITÄT-TEST.....	47
3.7	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS DES KNOBLAUCHS BZW. ALLICINS AUF <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> .....	47
3.7.1	<i>Zoosporenschlupf</i> .....	48
3.7.2	<i>Sporangien- und Zoosporenkeimung in vitro</i> .....	48
3.7.3	<i>Sporangien- und Zoosporenkeimung in vivo</i> .....	48
3.7.3.1	<i>Inokulation</i> .....	48
3.7.3.2	<i>Säurefuchsin-Färbung (modifiziert nach CARMICHAEL (1955))</i> .....	49

3.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR APOPTOSE-INDUKTION DURCH KNOBLAUCH AM BEISPIEL VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	49
3.8.1	<i>Glutathion-Messung</i> .....	49
3.8.2	<i>Caspase-Assay</i> .....	52
3.9	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN .....	53
3.9.1	<i>Aufreinigung von Nukleinsäuren</i> .....	53
3.9.1.1	Isolation von Plasmid-DNA.....	53
3.9.1.2	Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	53
3.9.1.3	RNA-Isolation aus Knoblauch (Phenol-Chloroform-Extraktion) .....	54
3.9.1.4	RNA-Isolation aus transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen (nach CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987; CHOMCZYNSKI & MACKEY, 1995).....	54
3.9.1.5	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	55
3.9.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	55
3.9.2	<i>Herstellung kompetenter Zellen</i> .....	56
3.9.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	56
3.9.2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	56
3.9.3	<i>Allgemeine Klonierungsmethoden</i> .....	56
3.9.3.1	DNase-Behandlung von RNA.....	56
3.9.3.2	cDNA-Synthese .....	56
3.9.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	57
3.9.3.4	Anhängen von A-Überhängen an PCR-Fragmente .....	60
3.9.3.5	Restriktion .....	61
3.9.3.6	Dephosphorylierung .....	62
3.9.3.7	Ligation.....	62
3.9.3.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	63
3.9.3.9	Transformationen.....	63
3.9.4	<i>Klonierung der Alliinase aus Allium sativum</i> .....	69
3.9.5	<i>Transkriptanalyse</i> .....	72
3.9.5.1	Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonde .....	72
3.9.5.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	73
3.9.5.3	Northern Blot Analyse .....	73
3.10	ISOLATION UND ANALYSE VON PROTEINEN.....	75
3.10.1	<i>Proteinextraktion aus Hefe</i> .....	75
3.10.1.1	Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot.....	75
3.10.1.2	Zur Ermittlung der Enzymaktivität transgener Alliinase .....	75
3.10.2	<i>Proteinextraktion aus Pflanzen</i> .....	76
3.10.2.1	Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot.....	76
3.10.2.2	Zur Ermittlung der Alliinase-Enzymaktivität .....	76
3.10.3	<i>Proteinmengenbestimmung nach LOWRY et al. (1951)</i> .....	77
3.10.4	<i>Proteinanalyse mittels Western Blot</i> .....	77
3.10.5	<i>Enzymaktivitätstests</i> .....	80
3.10.5.1	Alliinase-Assay (modifiziert nach SCHWIMMER & MAZELIS (1963)) .....	80
3.10.5.2	$\alpha$ -Amylase-Assay.....	81
3.11	STATISTIK.....	82

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>83</b>
4.1	ETABLIERUNG EINES ANALYSEVERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG DES ALLICINGEHALTS IN KNOBLAUCHSAFT .....	83
4.1.1	<i>HPLC</i> .....	83
4.1.2	<i>Kalibration des Bioassays anhand von HPLC-Daten</i> .....	84
4.2	VERGLEICH DER WIRKSAMKEIT VON IN KNOBLAUCHSAFT ENTHALTENEM UND REINEM ALLICIN IM BIOASSAY .....	85
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKPOTENTIAL VON KNOBLAUCHSAFT GEGEN PHYTOPATHOGENE ORGANISMEN .....	86
4.3.1	<i>Wirkung gegen Phytophthora infestans an Tomate in Klimakammer-Versuchen</i> .....	86
4.3.1.1	Bestimmung einer wirksamen Verdünnung des Knoblauchsafte und der entsprechenden Allicin- Konzentration.....	87
4.3.1.2	Einfluss verschiedener Behandlungsmethoden auf die Wirksamkeit des Knoblauchsafte .....	88
4.3.1.3	Einfluss verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Wirksamkeit des Knoblauchsafte.....	90
4.3.1.4	Untersuchungen zur Veränderung der Wirksamkeit des Knoblauchsafte zu verschiedenen Boniturzeitpunkten.....	91
4.3.1.5	Einfluss der Größe des umgebenden Raumes auf die Wirksamkeit des Knoblauchsafte .....	93
4.3.1.6	Untersuchungen zur Phytotoxizität des Knoblauchsafte.....	94
4.3.1.7	Versuche zur Formulierung von frischem Knoblauchsafte .....	95
4.3.2	<i>Untersuchung der Wirkung von Knoblauch gegen Phytophthora infestans im Freiland</i> .....	97
4.3.3	<i>Wirkung gegen Alternaria solani an Tomate in Klimakammer-Versuchen</i> .....	99
4.3.4	<i>Wirkung gegen Alternaria dauci und Alternaria radicina an Karotte (Daucus carota)</i> .....	100
4.3.4.1	Bestimmung einer als Samenbehandlung wirksamen Knoblauchsafte-verdünnung .....	102
4.3.4.2	Vergleich verschiedener Testverfahren (Erde vs. Agar) .....	103
4.3.4.3	Untersuchungen zur Einbringung des Knoblauchs in ein praxisübliches „Seed-Priming“-Verfahren	105
4.3.4.4	Überprüfung des Einflusses verschiedener Quellzeiten .....	106
4.3.4.5	Untersuchungen zur Lagerfähigkeit behandelter Samen.....	107
4.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS DES KNOBLAUCHSAFTES BZW. DES DARIN ENTHALTENEN ALLICINS.....	108
4.4.1	<i>Untersuchungen am Pathogen Phytophthora infestans</i> .....	108
4.4.1.1	Einfluss von Knoblauchsafte auf den Zoosporenschlupf von <i>Phytophthora infestans</i> .....	108
4.4.1.2	Einfluss von Knoblauchsafte auf die <i>in vitro</i> -Keimung von Sporangien bzw. encystierten Zoosporen von <i>Phytophthora infestans</i> .....	110
4.4.1.3	Einfluss von Knoblauchsafte auf das <i>in vitro</i> -Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von <i>Phytophthora infestans</i> .....	111
4.4.1.4	Einfluss von Knoblauchsafte auf <i>in vivo</i> - Keimung und –Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von <i>Phytophthora infestans</i> .....	113
4.4.2	<i>Einsatz von Dithiotreitol (DTT) im Bioassay</i> .....	115
4.4.3	<i>Untersuchungen am Modellorganismus Saccharomyces cerevisiae hinsichtlich einer Apoptose-Induktion</i> .....	116
4.4.3.1	Untersuchungen zur Verschiebung des Redox- Potentials in Hefezellen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )117	
4.4.3.2	Nachweis apoptotischer Hefezellen durch Anfärbung aktiver Caspasen (Caspase-Assay).....	119
4.5	SYNTHESE DER ALLIINASE AUS KNOBLAUCH IN FREMDORGANISMEN .....	122

4.5.1	<i>Synthese der Alliinase in Saccharomyces cerevisiae</i> .....	123
4.5.1.1	Nachweis des Proteins (Alliinase) mittels Western Blot.....	123
4.5.1.2	Aktivitätstest der „Hefe-Alliinase“.....	124
4.5.2	<i>Synthese der Alliinase in Arabidopsis thaliana</i> .....	125
4.5.2.1	Selektion von Pflanzen, die bezüglich des Alliinasegens homozygot sind.....	125
4.5.2.2	Nachweis des Transgens in homozygoten Pflanzen mittels PCR.....	127
4.5.2.3	Expressionsanalyse.....	129
4.5.2.4	Untersuchungen zur Klärung des Auftretens unerwarteter Banden bei der RT-PCR mit RNA aus transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	133
4.5.2.5	Überprüfung der Alliinase-Aktivität in transgenen <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	135
4.6	STUDIEN ZUR LOKALISATION DER ALLIINASE.....	137
4.6.1	<i>Transiente Expression einer Fusion putativer Alliinase-Signal-sequenzen und des <math>\alpha</math>-Amylasegens aus Gerste in Tabak-Protoplasten</i> .....	138
4.6.2	<i>Transiente Expression einer Fusion der putativen Alliinase-Signalsequenz und des GFP-Gens (Grün-fluoreszierendes Protein)</i> .....	142
4.6.2.1	Expression in Tabak-Protoplasten.....	143
4.6.3	Expression in Epidermiszellen der Zwiebel ( <i>Allium cepa</i> ).....	144
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>147</b>
5.1	ETABLIERUNG EINES ANALYSEVERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG DES ALLICINGEHALTS IN KNOBLAUCHSAFT.....	147
5.2	VERGLEICH DER WIRKSAMKEIT VON IN KNOBLAUCHSAFT ENTHALTENEM UND REINEM ALLICIN IM BIOASSAY.....	148
5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON KNOBLAUCHSAFT GEGEN PHYTOPATHOGENE ORGANISMEN ..	148
5.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKMECHANISMUS DES KNOBLAUCHSAFTES.....	159
5.5	SYNTHESE DER ALLIINASE AUS KNOBLAUCH IN FREMDORGANISMEN.....	163
5.6	STUDIEN ZUR LOKALISATION DER ALLIINASE AUS KNOBLAUCH.....	167
5.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	171
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>173</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>175</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>177</b>
<b>ANHANG 1</b>	.....	<b>192</b>
<b>ANHANG 2</b>	.....	<b>195</b>
<b>ANHANG 3</b>	.....	<b>198</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	.....	<b>214</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	.....	<b>217</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	.....	<b>218</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	.....	<b>220</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub></b>	demineralisiertes Wasser
<b>Al</b>	Alliinase	<b>HPLC</b>	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
<b>Alipro</b>	Alliinase mit putativer Signalsequenz	<b>kb</b>	Kilobasen
<b>bp</b>	Basenpaar(e)	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>c</b>	centi	<b>l</b>	Liter
<b>CSPD</b>	Chemilumineszenz Reagenz	<b>μ</b>	micro
<b>ctVSS</b>	C-terminales vakuoläres „Sorting-Signal“	<b>m</b>	milli
<b>cv.</b>	cultivare	<b>M</b>	Molar
<b>DIG</b>	Digoxigenin	<b>min</b>	Minute(n)
<b>dNTP's</b>	desoxy-Nukleotide	<b>n</b>	nano
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA	<b>OD</b>	optische Dichte
<b>DTT</b>	Dithiotreitol	<b>PAC</b>	„precursor-accumulating“
<b>ECL</b>	enzymatische Chemilumineszenz	<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>ER</b>	endoplasmatisches Reticulum	<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>g</b>	Gramm	<b>sec</b>	Sekunde(n)
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	<b>SI</b>	sekretorischer Index
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein	<b>ssVSS</b>	Sequenz-spezifisches vakuoläres „Sorting-Signal“
<b>GSH</b>	reduziertes Glutathion	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>GSSG</b>	oxidiertes Glutathion (Disulfid)	<b>TGN</b>	Trans-Golgi-Netzwerk
<b>h</b>	Stunde	<b>VSS</b>	vakuoläres „Sorting-Signal“
		<b>x g</b>	Erdbeschleunigung

# 1 EINLEITUNG

Von Jahr zu Jahr nimmt die weltweite Bevölkerung um 1,5% zu (RAVEN *et al.*, 2000), wodurch auch der Bedarf an landwirtschaftlichen Erzeugnissen weiter steigt. Die für die Produktion von Nutzgütern in Monokulturen angebauten Pflanzen sind jedoch vielen negativen Einflüssen, wie tierischen und mikrobiellen Schädlingen, Trockenheit und Nährstoffkonkurrenten ausgesetzt. Insbesondere der Schutz der Pflanzen vor Krankheiten, die zu einem kompletten Ausfall der Ernte führen können, stellt eine große Herausforderung für den Produzenten dar. Ständig entstehen neue Resistenzen gegen vorhandene Pflanzenschutzmittel, die deren Einsatz im Kampf gegen Pathogene wirkungslos machen. Aus diesem Grund müssen stetig neue Wirkstoffe gesucht und entwickelt werden. Dabei hat es sich schon häufig als hilfreich erwiesen, der Natur auf die Finger zu schauen und sich die natürlichen Abwehrstrategien von Pflanzen oder Pilzen bei der Suche nach neuen Pflanzenschutzmitteln zu Nutze zu machen. Auf diese Weise konnte z.B. in den 1990er Jahren die neue Fungizid-Klasse der Strobilurine entwickelt werden (SAUTER *et al.*, 1999). Hier nahmen sich die Forscher eine Substanz mit fungizider Wirkung zum Vorbild, die vom Kiefernzapfenrübling (*Strobilurus tenacellus*) gegen Nahrungskonkurrenten gebildet wird. Naturstoffe können aber nicht nur als Vorbild für neue Leitstrukturen von Pflanzenschutzmitteln dienen, sondern können auch selber als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden. Als Beispiel soll hier das Neemöl, das aus Samen des gleichnamigen Baumes (*Azadirachta indica*) gewonnen wird, genannt sein. Neben der insektiziden Wirkung, die dem Triterpenoid Azadirachtin zugeschrieben wird (BUTTERWORTH & MORGAN, 1968), sind auch nematizide und fungizide Wirkungen bekannt (JEYARAJAN *et al.*, 1986; ROVESTI *et al.*, 1992). Nicht zuletzt die zunehmende Bedeutung des ökologischen Landbaus und hier insbesondere das Verbot von Kupferpräparaten zur Bekämpfung falscher Mehlaupilze hat in den letzten Jahren zu einer gesteigerten Nachfrage nach biologischen Möglichkeiten des Pflanzenschutzes geführt. Darüber hinaus wird vom Verbraucher mit der Anwendung biologischer Bekämpfungsmittel eine geringere Umweltbelastung in Verbindung gebracht, was ihre Attraktivität noch steigert (SLUSARENKO *et al.*, 2008). Auf der Basis von Pflanzeninhaltsstoffen wurden jedoch hauptsächlich Insektizide entwickelt, die auch im organischen Landbau eingesetzt werden. Fungizide, deren Leitstrukturen oder die selber auf Naturprodukten beruhen, stammen hingegen alle aus Untersuchungen von Mikroorganismen (BLAESER *et al.*, 2002). Zu den natürlichen Verbindungen, die in den letzten Jahren zu Leitstrukturen für neue Fungizide wurden, zählen z.B. das Pyrrolnitrin aus *Pseudomonas* und *Burkholderia* sp., das Strobilurin A aus *Strobilurus tenacellus* und das Oudemansin aus *Oudemansiella mucida*. Betrachtet man jedoch die Literatur der letzten Jahrzehnte, so stößt man immer wieder auf Berichte, in denen beschrieben wird, dass

mit relativ geringem Aufwand eine vergleichsweise große Anzahl fungizid wirksamer Extrakte aus verschiedenen Pflanzenarten gewonnen werden kann. So fanden KLINGAUF & HERGER (1985) in über der Hälfte von mehr als hundert getesteten Pflanzenextrakten eine Wirkung gegen den Echten Mehltau an Gerste (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Demnach scheint auch die Suche nach fungiziden Wirkstoffen in Extrakten der verschiedenen Pflanzenspezies erfolgversprechend zu sein. Die vorliegende Arbeit soll mit der Untersuchung des Knoblauchsafte hinsichtlich eines möglichen Einsatzes im Pflanzenschutz einen Beitrag zu dieser Suche leisten.

In der Literatur wurde mehrfach eine fungizide Wirkung des Knoblauchs beschrieben. So konnten LAKSHMANAN *et al.* (1990) eine deutliche Reduzierung einer *Thanatephorus cucumeris*-Infektion von Bohnen durch Applikation von Blattextrakten des Knoblauchs nachweisen. MENON zeigte 1994, dass durch eine Sprühbehandlung mit Knoblauchextrakt sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland eine Infektion von Hirse mit *Claviceps sorghi* unterdrückt werden kann. 2004 beobachteten CURTIS *et al.* *in vitro* und *in planta* eine Wirksamkeit von Knoblauchsafte gegen ein breites Spektrum von phytopathogenen Organismen. Basierend auf diesen Ergebnissen, sollte in der vorliegenden Arbeit das Wirkpotential des Knoblauchs bzw. seiner Inhaltsstoffe gegen Oomyceten und Pilze mit Hilfe der Krankheitserreger *Phytophthora infestans* und *Alternaria* sp. genauer untersucht werden. Neben gängigen Pflanzenschutzmaßnahmen, wie z.B. Sprühapplikationen und Samenbehandlungen, die besonders für den ökologischen Landbau interessant sein könnten, sollten auch die Grundlagen für einen gentechnischen Ansatz erforscht werden. So sollte das Gen der Alliinase, die im Knoblauch die Umsetzung des Alliins zum antimikrobiell wirksamen Allicin katalysiert, in die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eingebracht werden. Dies sollte die Frage beantworten, ob die Synthese einer aktiven Alliinase aus Knoblauch in Pflanzen einer fremden Spezies möglich ist. Die Idee für einen möglichen Nutzen in der Landwirtschaft bestand darin, die Alliinase in Kulturpflanzen einzubringen, um durch eine Applikation des Alliinasesubstrats Alliin, welches wesentlich stabiler und leichter synthetisierbar ist als das Allicin, eine erhöhte Resistenz der Pflanzen gegen phytopathogene Organismen hervorzurufen. Darüber hinaus wäre es denkbar, durch weitere Transformationen den gesamten Syntheseweg vom Cystein über das Cysteinderivat Alliin zum Allicin in Nutzpflanzen einzubringen. Auf diese Weise könnten möglicherweise transgene Pflanzen erzeugt werden, die in der Lage sind mit Hilfe des Allicins Pathogene abzuwehren.

Durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, insbesondere von systemischen Wirkstoffen, kommt es häufig zum Auftreten von Resistenzen. Dies macht vor allem die Suche nach Substanzen mit neuen Wirkmechanismen unumgänglich (EVANS & LAWSON, 1992). Aus diesem Grund sollten Versuche mit den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*, aber auch mit *Phytophthora infestans*, zur Klärung des Wirkmechanismus des Knoblauchs bzw. des Allicins durchgeführt werden. Dabei sollte auch die Apoptose-Induktion durch Knoblauchsaft untersucht werden.

## 1.1 Knoblauch und Allicin

Knoblauch (*Allium sativum* L.) gilt als Vertreter der Lauchgewächse (*Alliaceae*) aus dem Reich der Liliengewächse (*Liliaceae*) und zählt zur Gattung *Allium*, der unter anderem auch die Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.), der Bärlauch (*Allium ursinum* L.) und der Schnittlauch (*Allium schoenoprasum* L.) angehören. Den Charakter dieser Gattung prägen die ihnen allen gemeinsamen Organoschwefelverbindungen, die für ein breites Spektrum biologischer Wirkungen verantwortlich gemacht werden. Dazu zählen neben vielen anderen die Krebsvorbeugung, antimikrobielle Aktivität, Geruchs-, Geschmacks- und tränenreizende Eigenschaften (BLOCK, 1992). So wurden Teile und Extrakte des Knoblauchs bereits vor Jahrtausenden als Lebensmittelzusatz und zur medizinischen Therapie eingesetzt. Vor der Entwicklung moderner Antibiotika wurden Epidemien, wie Typhus, Cholera, Ruhr, Amöbenruhr, Diphtherie und Tuberkulose mit Knoblauch-Präparaten behandelt (*Ibid.*). Darüber hinaus wurde auch eine fungizide Eigenschaft flüchtiger Bestandteile der Knoblauchzehe beobachtet, die zum Schutz der Pflanze vor eindringenden Mikroorganismen dienen könnte (*Ibid.*).

Bereits im 19. Jahrhundert gelang die Isolierung organischer Verbindungen aus Knoblauch in Form von ätherischen Ölen, deren Hauptinhaltsstoffe als Disulfide identifiziert wurden (WERTHEIM, 1844; SEMMLER, 1892). 1944 konnten CAVALLITO & BAILEY die, nach Meinung der Autoren, maßgeblich für die antimikrobielle Wirkung und gleichzeitig für den charakteristischen Geruch des Knoblauchs verantwortliche Substanz extrahieren und als Diallyl-Thiosulfinat identifizieren. Sie gaben ihr den Namen *Allicin*. CAVALLITO & BAILEY konnten zeigen, dass weder das Allicin noch andere flüchtige Substanzen der *Allium*-Gewächse in der intakten Pflanze vorliegen, sondern diese erst beim Aufschluß der Pflanze oder ihrer Teile gebildet werden. Sobald das Gewebe verletzt wird, wird das Allicin innerhalb von Millisekunden mit Hilfe des Enzyms Alliinase (EC 4.4.1.4) aus seiner stabilen Vorstufe, dem Alliin ((+)-S-2-Propenyl-L-

cystein-S-oxid) gebildet. Bei der Reaktion (Abb. 1) werden zunächst zwei Moleküle Alliin durch die Alliinase in zwei Moleküle Allylsulfensäure umgesetzt, die anschließend spontan zum Allicin kondensieren (STOLL & SEEBECK, 1949).

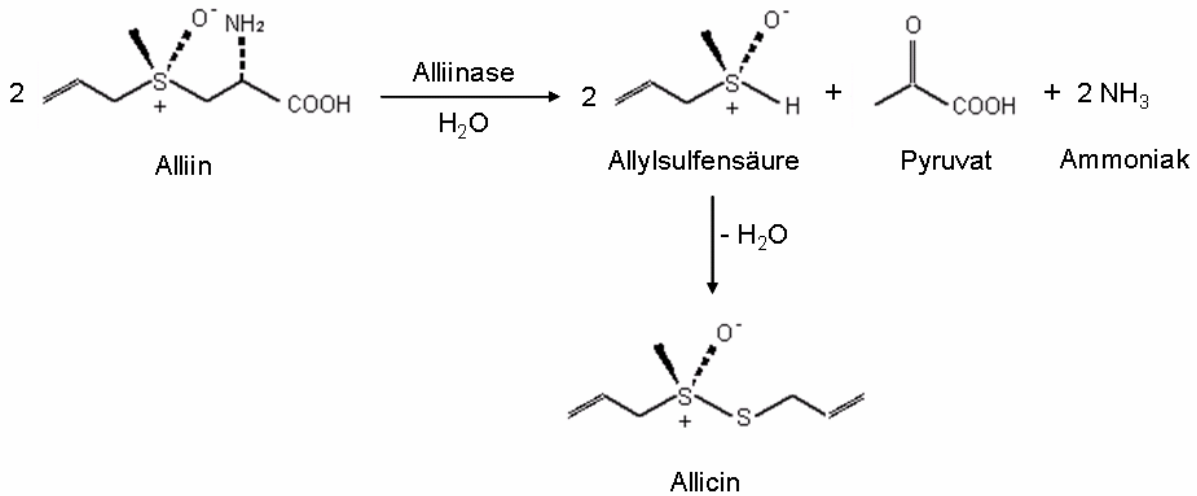


Abb. 1: Reaktionsschema der Umsetzung von Alliin zu Allicin durch die Aktivität der Alliinase

Das entstehende Allicin ist eine flüchtige und höchst instabile Verbindung, die eine Vielzahl von Umwandlungs- und Zerfallsprodukten aufweist. Eine häufig auftretende Reaktion des Allicins ist die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion (MIRON *et al.*, 2002; Abb. 2). Eine solche Reaktion des Allicins mit freien Thiol-Gruppen von Enzymen wird für seine antimikrobielle Wirkung verantwortlich gemacht. So konnten HAN *et al.* (1993) eine Aktivierung der Fructose-1,6-Bisphosphatase in Hühnerleber durch Allicin nachweisen. Dies führte zu einem Verlust der Aktivierung des Enzyms durch  $\text{K}^+$  und zu einer geringeren Sensitivität gegenüber der natürlichen Inhibierung durch AMP, Fructose-2,6-bisphosphat und eine erhöhte Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentration. Laut den Autoren war dies auf die Wechselwirkung des Allicins mit den reaktiven SH-Gruppen des Enzyms zurückzuführen. Ein ähnlicher Effekt konnte von ANKRI *et al.* (1997) bei Cysteinproteinasen und Alkoholdehydrogenasen von *Entamoeba histolytica* beobachtet werden. Diese Enzyme wurden durch die Reaktion des Allicins mit ihren SH-Gruppen deutlich inhibiert.



Abb. 2: Reaktionsschema der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion des Allicins

Auch die Umwandlungs- und Zerfallsprodukte des Allicins haben teilweise einen antimikrobiellen Effekt oder zeigen andere interessante biologische Wirkungen. Besonders hervorzuheben ist das Ajoen, das zu einer Hemmung der Blutplättchenaggregation führt und somit das Risiko von Herzinfarkten und Thrombosen reduziert. Darüber hinaus ist auch eine fungizide Wirkung des Ajoens nachgewiesen worden (YOSHIDA *et al.*, 1987; SINGH, 1990; SANBLAS *et al.*, 1989).

Das an der Umsetzung des Alliins zum Allicin maßgeblich beteiligte Enzym, die Alliinase (EC 4.4.1.4) ist eine Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige C-S-Lyase, die C<sub>β</sub>-S<sub>γ</sub>-Bindungen von Sulfoxidderivaten der Aminosäure Cystein spaltet. Sie setzt das natürlich vorkommende L(+)-Diastereomer des Alliins schnell und quantitativ um, wohingegen sie mit dem bei der Synthese von Alliin aus L-Cystein ebenfalls entstehenden (-)-Diastereomer deutlich langsamer und mit den Derivaten des D-Cysteins gar nicht reagiert. Es handelt sich bei der Alliinase um ein Homodimer, das sich aus zwei Untereinheiten mit jeweils 448 Aminosäuren zusammensetzt. Jede der Untereinheiten weist ein Molekulargewicht von ca. 52 kDa auf und besitzt vier putative N-Glykolysierungsstellen (RABINKOV *et al.*, 1994; KUETTNER *et al.*, 2002 a, b). Die Alliinase macht einen Großteil des Gesamt-Proteingehalts in Zwiebeln und Blättern der *Allium*-Gewächse aus (VAN DAMME *et al.*, 1992). Da das Protein durch eine Genfamilie kodiert wird, besteht selbst innerhalb einer Spezies eine Sequenzheterogenität und es finden sich in der Literatur verschiedene cDNA-Sequenzen. So veröffentlichten z.B. RABINKOV *et al.* (1994) und VAN DAMME *et al.* (1992) leicht voneinander abweichende cDNA-Sequenzen der Alliinase aus Knoblauch. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Sequenzen besteht in den ersten ca. 100 bp, die von VAN DAMME *et al.* als mögliche Signalsequenz für den Transport des Proteins in die Vakuole angegeben werden. 1981 wiesen LANCASTER *et al.* die Lokalisation der Alliinase in der Vakuole von Zwiebeln der Küchenzwiebel (*Allium cepa*) nach. Das Substrat, das Isoalliin (*S*-(*E*)-1-Propenyl-L-cystein-*S*-oxid), befindet sich laut der Autoren im Cytoplasma. Da das Allicin des Knoblauchs ebenfalls erst nach einer Verletzung des Gewebes gebildet wird, wird angenommen, dass die Ansiedlung des Enzyms und seines Substrats in verschiedenen Kompartimenten der Zelle auch für die Knoblauchpflanze zutrifft. Bisher konnten sowohl ELLMORE & FELDBERG (1994) als auch YAMAZAKI *et al.* (2002) lediglich die Anreicherung der Alliinase in Bündelscheidenzellen nachweisen, wo sie 10-12% des Gesamtproteins ausmacht. Die subzelluläre Lokalisation ist jedoch weiterhin ungeklärt. Da es für den beschriebenen gentechnischen Ansatz in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sein könnte, wohin das Enzym

transportiert wird, sollte in einem Teilprojekt dieser Arbeit die Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht werden.

## 1.2 Phytopathogene und Pathosysteme

### 1.2.1 *Phytophthora infestans*

*Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel und der Braunfäule an Tomate, zählt, vor allem im Kartoffelbau, zu den wichtigsten Pathogenen. Bereits im 19. Jahrhundert führte der Ausbruch dieser Pflanzenkrankheit in Irland zur Vernichtung ganzer Kartoffelbestände und in Folge dessen zu einer weit reichenden Hungersnot (SCHÖBER-BUTIN, 2001).

1876 grenzte DE BARY die Gattung *Phytophthora* von der Gattung *Peronospora* ab und gab dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule seinen heute noch gültigen Namen *Phytophthora infestans*.

*P. infestans* zeichnet sich, wie alle zur Klasse der Oomycota gehörenden Spezies, durch ein unseptiertes, farbloses, vielkerniges Myzel aus, das sich rechtwinklig verzweigt. Die asexuell entstehenden Sporangien werden auf speziellen Traghyphen, den Sporangiphoren, gebildet und durch Wind oder Regen verbreitet (AGRIOS, 2005). Sie können entweder mit einem Keimschlauch auskeimen und so als Konidium fungieren oder zwei bis 25 nierenförmige, einkernige Zoosporen freisetzen, die zwei lateral angesetzte Geißeln besitzen (MÜLLER, 1929; ULLRICH & SCHÖBER, 1972; DESJARDINS *et al.*, 1969). Treffen die Zoosporen auf eine feste Oberfläche, ziehen sie die Geißeln ein und bilden eine feste Wand, man spricht dann von einer encystierten Zoospore. Diese kann ebenfalls mit einem Keimschlauch auskeimen (BARTNICKI-GARCIA, 1973; FITZPATRICK, 1930; ROBERTSON, 1991). Am Ende des Keimschlauchs wird ein Appressorium gebildet, mit dem die Epidermis mechanisch durchbrochen wird. Über die Stomata kann der Erreger jedoch auch direkt in das pflanzliche Gewebe eindringen. Anschließend breitet sich das Myzel interzellulär im gesamten Blatt aus und dringt mit Hilfe von Haustorien in die Zellen ein, bevor erneut Sporangiphoren gebildet werden (AGRIOS, 2005). Neben der vegetativen Vermehrung des Pilzes existiert auch ein sexueller Lebenszyklus (siehe Abb. 3). Dabei werden festsitzende Gametangien ausgebildet, die aus dem hyalinen Oogonium und dem Antheridium bestehen. Nach der Befruchtung der Eizelle entsteht eine dickwandige Dauerspore, die sogenannte Oospore, die auskeimen und wiederum Sporangien bilden kann (VON ARX, 1968). Damit beginnt der asexuelle oder vegetative Vermehrungszyklus. Da es sich

bei *Phytophthora infestans* um eine heterothallische Form der Gattung *Phytophthora* handelt, müssen für die sexuelle Vermehrung Hyphen der beiden Paarungstypen A1 und A2 aufeinander treffen (GALINDO & GALLEGLY, 1960).

Im Feld beginnt die Entwicklung des Erregers für gewöhnlich mit der asexuellen Phase auf der infizierten Pflanzknolle, von wo aus er in den sich entwickelnden Spross wächst. Dort breitet sich das Myzel in den Blättern aus und schiebt die Sporangiphoren durch Spaltöffnungen nach außen, wo sich die Sporangien entwickeln. Bei Temperaturen über 15°C keimen diese direkt aus und können mit Hilfe ihrer Keimschläuche leicht in verletztes Knollengewebe eindringen. Nach ULLRICH (1970) können die Keimschläuche der Sporangien jedoch nicht in Blattgewebe eindringen, so dass es auf Blättern lediglich zu einer Kettenbildung von Sporangien kommt, solange keine Zoosporen gebildet werden, die auch die Blätter befallen können. Für die indirekte Keimung, also die Zoosporenbildung, sind Temperaturen unter 15°C und Wassertropfen notwendig. Die nach dem Auskeimen der Zoosporen und Durchwachsen des Blattes gebildeten Sporangien werden durch Regen in den Boden eingebracht und erreichen so oder über Verletzungen bei der Ernte die Knollen. Hier kann der Pilz überwintern und im Folgejahr den Kreislauf neu beginnen.

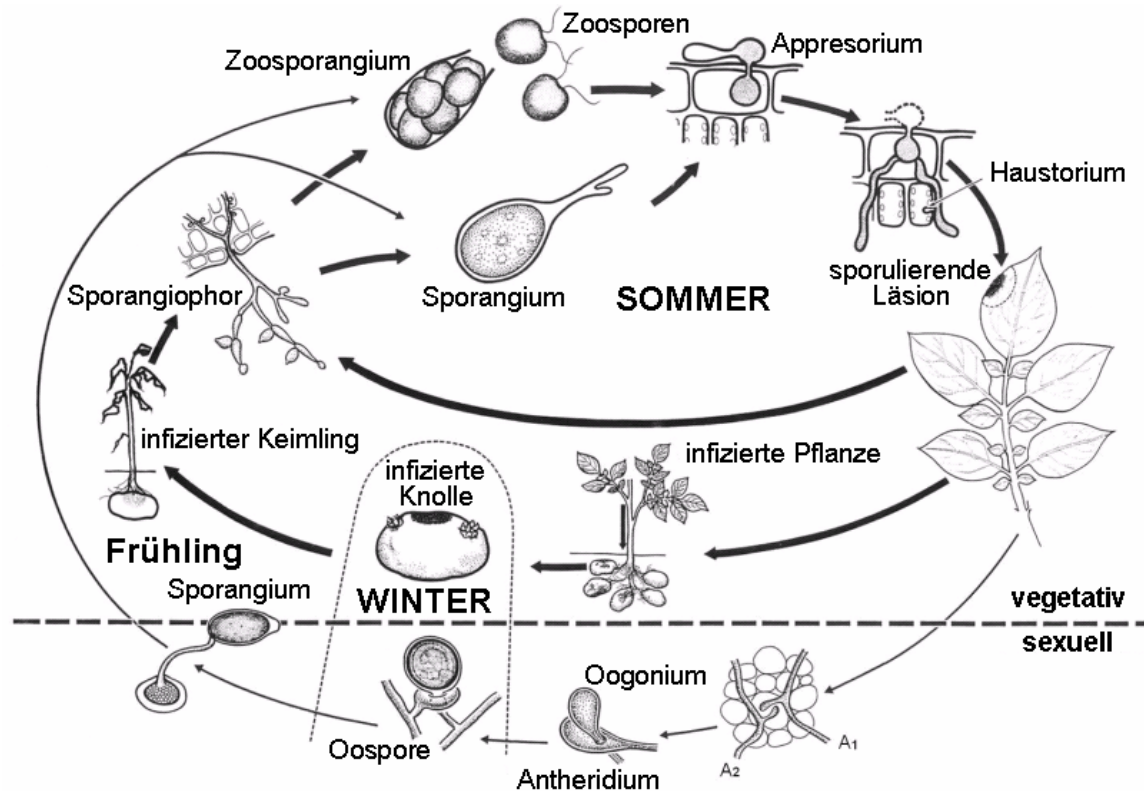


Abb. 3: Lebenszyklus von *Phytophthora infestans* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom LABOR FÜR PHYTOPATHOLOGIE DER UNIVERSITÄT WAGENINGEN)

Die typischen Symptome von *Phytophthora infestans* sind anfänglich gelblich-grüne Blattflecken, die sich in kurzer Zeit dunkel verfärben. Bei Feuchtigkeit ist auf der Blattunterseite am Rand der Befallsstelle ein weißer Myzelrasen zu erkennen. Auch ein Befall der Stängel ist möglich. An den Kartoffelknollen sind bleigraue unregelmäßige Flecken zu sehen, unter denen das Knollengewebe braun verfärbt ist. An Tomatenfrüchten werden anfangs grau-grüne, später schmutzig-braune, leicht runzelige Flecken sichtbar. Das befallene Gewebe stirbt langsam ab.

### 1.2.2 *Alternaria* spp.

Obwohl die meisten Angehörigen der Gattung *Alternaria* saprophytisch sind, zählt auch eine Vielzahl pilzlicher Krankheitserreger zu dieser Gattung, die ein breites Spektrum landwirtschaftlicher Nutzpflanzen befallen (THOMMA, 2003).

Die Gattung wurde 1817 von NEES VON ESENBECK durch die Beschreibung von *Alternaria tenuis* etabliert und wird zu den *Fungi Imperfecti* gezählt. Für Angehörige dieser Pilz-Gruppe sind keine sexuellen Stadien bekannt.

Typisch für alle *Alternaria*-Spezies ist die Bildung großer, vielzelliger Konidien, die sowohl longitudinal als auch transversal septiert sind. Durch die Einlagerung von Melanin sind sie darüber hinaus dunkel gefärbt. Die Konidien werden einzeln oder in Ketten auf kurzen aufrechten Konidiophoren als Ausstülpungen dieser gebildet (HONDA *et al.*, 1987). Sie können leicht von den Konidiophoren abgetrennt und durch Wind, Regen usw. verbreitet werden. Sobald die Sporen auf Pflanzenmaterial gelandet sind, keimen sie aus und infizieren das Gewebe direkt oder durch Wunden. Anschließend werden erneut Konidiophoren und Konidien gebildet (AGRIOS, 2005; Abb. 4). Während der Vegetationsperiode infizieren die Konidien so immer neue Pflanzen. Den Winter überleben Konidien und Myzel in oder an infizierten Samen oder Pflanzenresten.

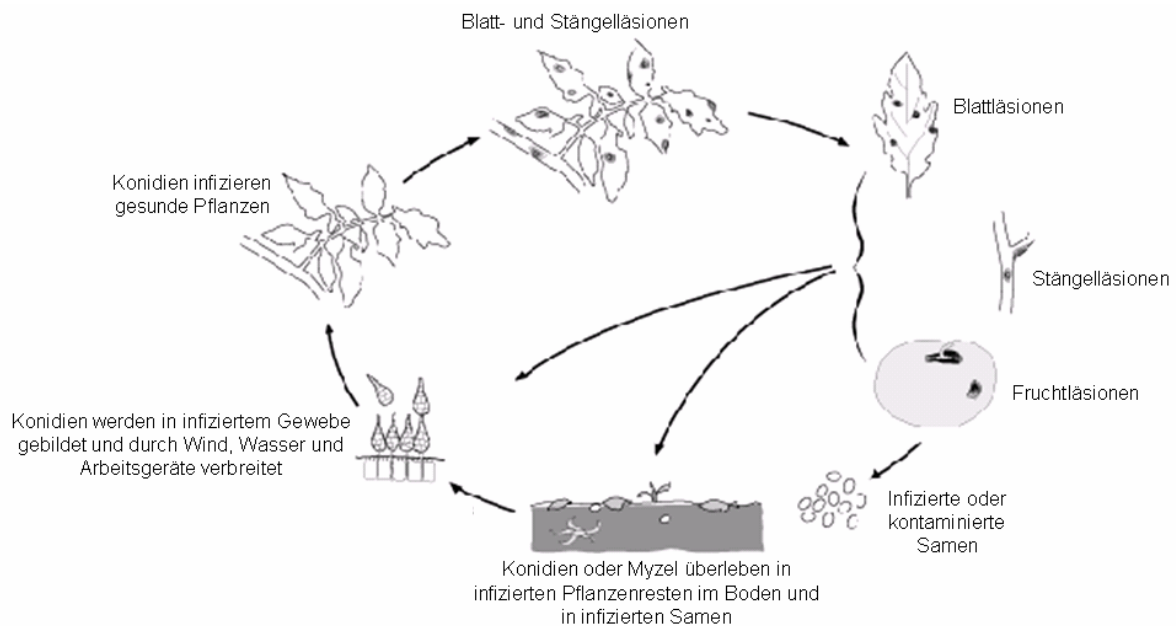


Abb. 4: Lebenszyklus von *Alternaria (solani)* (nach HADDERS, 2006)

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl mit *Alternaria solani*, dem Erreger der Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel und Tomate gearbeitet, als auch mit *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina*, die die Möhrenschräge bzw. die Schwarzfäule an Karotte hervorrufen.

*Alternaria solani* lässt sich durch meist runde, braune Flecken auf älteren Blättern erkennen, die klar vom gesunden Gewebe abgegrenzt sind. Auch die Stängel können befallen werden. Besonders auffallend sind die sich häufig bildenden konzentrischen schwarzen Ringe in den Flecken. Die Flecken können aufreißen und Teile des braunen Gewebes herausbrechen. An der Kartoffelknolle bilden sich auf der Schale eingesunkene, bräunlich-schwarze Flecken, die einige Millimeter ins Knollengewebe hineinreichen und ebenfalls klar vom gesunden Gewebe abgegrenzt sind. An den Früchten der Tomate bilden sich in der Nähe des Fruchtsielansatzes schwärzliche, lederartige, leicht eingesunkene Flecken mit zum Teil ebenfalls konzentrischer Zonierung.

Bei einem Befall von Karottensamen können sowohl *Alternaria dauci* als auch *Alternaria radicina* Auflaufschäden verursachen. In diesem Fall keimen die Samen entweder gar nicht aus oder die Keimlinge sterben frühzeitig ab. Bei einer späteren Infektion kann sowohl das Laub als auch der Möhrenkörper befallen werden. Auf dem Laub kommt es zunächst zu kleinen, punktförmigen Nekrosen, die später verschmelzen und zur schwarzen Verfärbung des gesamten

Laubs führen können. Auf dem Möhrenkörper bilden sich oberflächliche, schwarze Flecken, die unregelmäßig geformt sind.

### 1.3 Die Apoptose

Die Induktion von Apoptose durch Allicin konnte bereits von verschiedenen Autoren bei Krebszellen nachgewiesen werden (SUN & WANG, 2003; ZHANG *et al.*, 2006). Im Verlauf der Untersuchungen des Wirkmechanismus des Knoblauchs sollte mit Hilfe des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* getestet werden, ob auch bei Pilzen eine Apoptose-Induktion durch das im Knoblauchsft vorhandene Allicin stattfindet.

Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltodes, ist ein streng geregelter Vorgang, der für die Entwicklung, die Erhaltung und das Altern von mehrzelligen Organismen unverzichtbar ist. Die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen wurden das erste Mal 1972 von KERR *et al.* beschrieben. Bei tierischen Zellen gehören die Blasenbildung an der Plasmamembran, der Volumenverlust der Zelle, die Vakuolisierung des Cytoplasmas, die Chromatin-Kondensation und der Zerfall des Zellkerns zu den typischen Merkmalen. Während der Apoptose werden basophile Körper gebildet, die von der Zellmembran umgeben sind, so dass keine intrazellulären Bestandteile freigesetzt werden, was eine schädliche Wirkung auf benachbarte Zellen haben könnte (LODISH *et al.*, 2007). Die Apoptosekörper können von Makrophagen erkannt und phagozytiert oder von benachbarten Zellen aufgenommen werden. Der komplexe Mechanismus der Apoptose wird über zwei Wege reguliert, den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg (CIRIOLO, 2005). Der *extrinsische* Weg wird durch Rezeptoren, wie den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), das CD95/APO1/Fas-Rezeptorsystem und den TNF-ähnlichen Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) vermittelt. Dieser Weg beinhaltet darüber hinaus Inhibitoren und Rezeptor-gebundene cytoplasmatische Proteine, die für die Aktivierung der Procaspasen durch Ligandenbindung notwendig sind (PETER & KRAMMER, 2003). Im Mittelpunkt des *intrinsischen* Weges stehen die Mitochondrien, die eine wichtige Rolle im Apoptose-Signalweg spielen. Eine Fehlfunktion in jedem Bereich der Zelle kann durch die Öffnung eines Porenkomplexes zur Freisetzung von Apoptose-Faktoren aus dem mitochondriellen Intermembranraum führen und damit zum kontrollierten Zelltod (KROEMER & REED, 2000). Beide Wege können durch eine Vielzahl an Faktoren ausgelöst werden. Externe Apoptose auslösende Signale sind z.B. UV-Licht, Röntgenstrahlen, Gammastrahlen, Oxidation, Hitzeschock, Cytotoxine oder Schwermetalle. Als Beispiel für interne Signale seien Änderungen

im Hormonspiegel und Schäden z.B. der DNA genannt. Darüber hinaus können sowohl interne als auch externe Faktoren, die oxidativen Stress bewirken, zur Induktion von Apoptose führen. Viele der genannten Auslöser bedingen sich auch gegenseitig, wie in Abbildung 5 verdeutlicht werden soll.

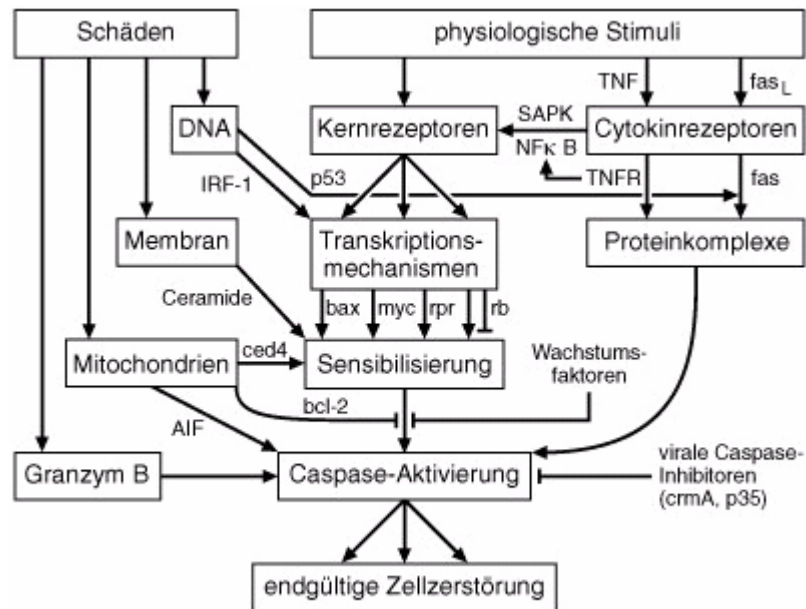


Abb. 5: Auslöser für die Öffnung der Mitochondrienporenkomplexe und damit Induktion der Apoptose (nach COLLATZ, 2001) über den intrinsischen Signalweg

NGF = „Nerve growth factor“

An der Regulation der Apoptose ist eine große Anzahl von Proteinen beteiligt, die teilweise pro-apoptotisch (z.B. Bax) und teilweise anti-apoptotisch (z.B. Bcl-2) wirken. Die Mechanismen der Regulation durch die verschiedenen Proteine sind sehr verschieden, doch münden sie alle in der Aktivierung einer Kaskade von Caspasen. Caspasen sind die Effektor-Proteine der Apoptose und bekamen ihren Namen aufgrund des Cystein-Restes im katalytischen Zentrum und der Tatsache, dass sie Proteine selektiv C-terminal zum Aspartat-Rest spalten. Alle Caspasen liegen zunächst als Procaspasen in der Zelle vor, so dass für ihre Aktivierung ein Teil des Proteins abgespalten werden muss (LODISH *et al.*, 2007). Abbildung 6 soll einen Überblick über die Apoptoseereignisse geben.

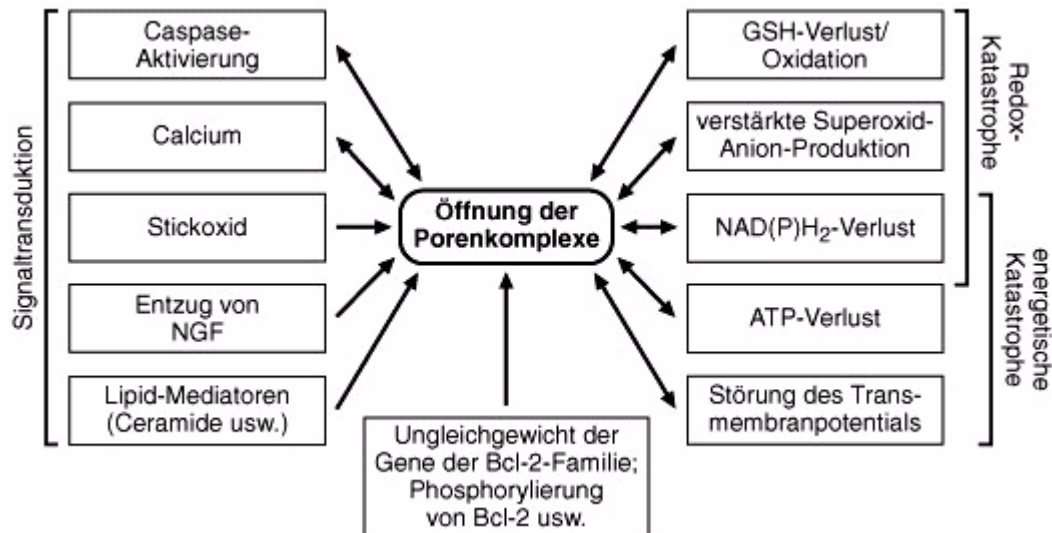


Abb. 6: Schematische Übersicht über Apoptoseereignisse (nach COLLATZ, 2001)

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, kann auch die Veränderung des Redox-Status einer Zelle zur Apoptose der entsprechenden Zelle führen. Das Redox-Gleichgewicht einer Zelle wird durch verschiedene Redox-Paare, wie  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ , das Thioredoxin-System ( $\text{TrxSS} / \text{Trx}(\text{SH})_2$ ) oder das Glutathion-Paar ( $\text{GSSG} / 2\text{GSH}$ ) aufrecht erhalten. Dabei stellt das Redox-Paar  $\text{GSSG} / 2\text{GSH}$  den größten Anteil und kann aus diesem Grund als Indikator für den Redox-Status von Zellen fungieren (SCHAFER & BUETTNER, 2001). Darüber hinaus beschrieben SCHAFER und BUETTNER (2001), dass der Redox-Status eines Redox-Paares über dessen Reduktionspotential ( $E_{\text{hc}}$ ) definiert ist, welches mit Hilfe der *Nernst-Gleichung* berechnet werden kann. Als Beispiel die Gleichung zur Berechnung des Reduktionspotentials des Glutathion-Paares ( $\text{GSSG} / 2\text{GSH}$ ):

$$E_{\text{hc}} = -240 - \frac{59,1}{2} \log \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \quad \text{mV}$$

Darüber hinaus berichteten die Autoren, dass das Reduktionspotential des Glutathion-Paares mit dem biologischen Status der Zelle korreliert (siehe Abb. 7). Bei einem  $E_{\text{hc}}$  von -260 mV bis -210 mV befindet sich die Zelle im Status der Proliferation. Ein  $E_{\text{hc}}$  von -210 mV bis -180 mV führt zur Differenzierung der Zelle, wohingegen durch ein  $E_{\text{hc}}$  von -180 mV bis -160 mV Apoptose induziert wird. Sinkt das Reduktionspotential noch weiter, so ist die Zelle nicht mehr in der Lage in Apoptose zu gehen und es wird Nekrose ausgelöst.

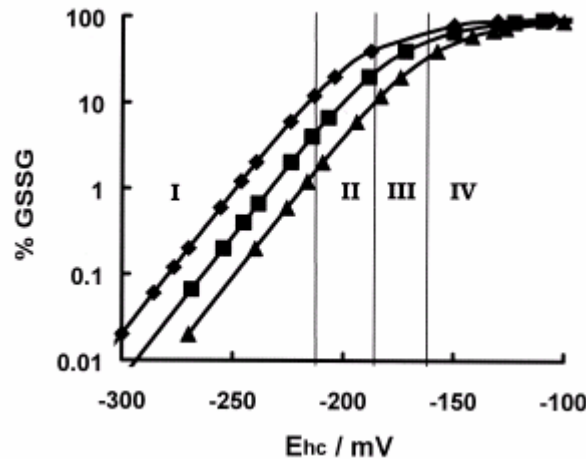


Abb. 7: Zusammenhang zwischen dem Reduktionspotential des Redox-Paares GSSG / 2GSH und dem physiologischen Status einer Zelle (nach SCHAFER & BUETTNER, 2001)

◆ = 10 mM, ■ = 3 mM GSH, ▲ = 1 mM; I = Proliferation, II = Differenzierung, III = Apoptose, IV = Nekrose

### 1.3.1 Apoptose in Hefe

1997 beschrieben MADEO *et al.* das Phänomen der Apoptose, das bisher nur für mehrzellige Organismen bekannt war, auch für Hefe. Die Mutation des AAA-ATPasegens *CDC48* induzierte die typischen Apoptose-Merkmale, wie Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung. In den folgenden Jahren konnten verschiedene Induktoren der Hefe-Apoptose identifiziert werden, darunter  $H_2O_2$  (MADEO *et al.*, 1999), Essigsäure (LUDOVICO *et al.*, 2001) und Salzstress (HUH *et al.*, 2002). 2002 wiesen MADEO *et al.* nach, dass für die Apoptose-Induktion durch  $H_2O_2$  in *Saccharomyces cerevisiae* ein Protein der Familie der Metacaspasen, das *Yca1/Mca1*, notwendig ist. Später konnte das *Yca1* auch mit Apoptose-Ereignissen, die durch andere Stimuli, wie Salzstress oder Toxine, induziert wurden, in Verbindung gebracht werden (BETTIGA *et al.*, 2004; FANNJIANG *et al.*, 2004). Des Weiteren ist ein humanes *CDC48*-Ortholog (VCP) ebenfalls an der Regulation von Apoptose in Hefe beteiligt (SHIROGANE *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass Hefe als Modellorganismus zur Untersuchung von Apoptose genutzt werden kann und so eine Verbindung zwischen tierischen Systemen und Pilzen bzw. pilzähnlichen Organismen darstellen kann.

## 1.4 Protein-Transportwege in Pflanzenzellen

Neben den gängigen Studien zum möglichen Einsatz des Knoblauchsafte im Pflanzenschutz, zu denen auch die Untersuchung des Wirkmechanismus gehört, sollte in der vorliegenden Arbeit

auch ein gentechnischer Ansatz getestet werden. Um zu klären, ob es möglich ist eine aktive Knoblauch-Alliinase in Pflanzen einer fremden Spezies zu synthetisieren, sollte dies zunächst mit der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* versucht werden. Im Zusammenhang mit diesem Projekt sollte auch die Funktion verschiedener veröffentlichter Signalsequenzen des Alliinasegens untersucht werden, um eine mögliche Vorhersage der intrazellulären Lokalisation bzw. des Transports der Alliinase machen zu können. In der Literatur wurde bisher lediglich die vakuoläre Lokalisation der Alliinase in Zellen der Küchenzwiebel beschrieben, durch die das Enzym von seinem Substrat getrennt vorliegt (LANCASTER *et al.*, 1981). Eine ähnliche Situation wird auch für die Alliinase aus Knoblauch angenommen.

Bei Eukaryoten werden Polypeptide, die von Kerngenen codiert werden, im Cytosol synthetisiert. Sind die Proteine für ein Zellkompartiment bestimmt, müssen sie durch einen gezielten Mechanismus dorthin transportiert werden. Polypeptide, die für das Cytosol oder den Import in den Kern, die Mitochondrien, Chloroplasten oder Peroxisomen bestimmt sind, werden nach der Synthese vom Ribosom freigesetzt und verbleiben entweder im Cytosol oder werden in eine der genannten Zellorganellen transportiert (*posttranslationaler* Import) (RAVEN *et al.*, 2000). Ist der Bestimmungsort eines Polypeptids ein Kompartiment des Endomembran-Systems, also des sekretorischen Systems, so wird das entsprechende Ribosom in einem frühen Stadium der Synthese an das endoplasmatische Reticulum (ER) angeheftet (*Ibid.*). Der Transport des Ribosoms und seine Anheftung an die Membran des rauen ER wird durch cytoplasmatische Ribonucleoprotein-Partikel, die Signal-Erkennungspartikel (SRP, engl.: signal recognition particles) vermittelt (LÜTCKE, 1995). Insgesamt erfüllen die SRPs drei verschiedene Aufgaben. Sie erkennen und binden das Signalpeptid, welches ein Teil des entstehenden Polypeptids ist und auf der Oberfläche des translatierenden Ribosoms präsentiert wird, verzögern jede weitere Elongation und sorgen für die Anheftung des Komplexes aus SRP, Ribosom und Polypeptid an die ER-Membran. Anschließend lösen sich die SRPs wieder vom Signalpeptid und dem Ribosom und binden das nächste Signalpeptid (*Ibid.*). Das Polypeptid wird während seiner Synthese durch die Membran des ER transportiert oder direkt in die Membran eingebaut (RAVEN *et al.*, 2000). Nachdem das Signalpeptid abgeschnitten wurde, verbleibt das fertige Polypeptid entweder im Lumen des ER oder wird, in Abhängigkeit vom Bestimmungsort, zum Golgi-Apparat und anderen Zellkompartimenten transportiert (*co-translationaler* Import) (*Ibid.*).

Hinsichtlich des sekretorischen Systems handelt es sich bei Pflanzen um typische Eukaryoten. Sie beinhalten die normalen Endomembranorganellen, wie das endoplasmatische Reticulum, den

Golgi-Apparat, die Plasmamembran und die Vakuole. In ihrer Funktion unterscheiden sich diese Organellen in Pflanzen jedoch teilweise deutlich von denen anderer Eukaryoten. So dient das ER zumindest teilweise der Lagerung von Proteinen (SANDERFOOT & RAIKHEL, 2003). Darüber hinaus ist die Vakuole wesentlich größer und kann in der ausgewachsenen Pflanzenzelle fast das gesamte Zellvolumen einnehmen (*Ibid.*). Pflanzliche Vakuolen sind an der Aufrechterhaltung des Zellurgors beteiligt, können aber auch der Einlagerung von toxischen Stoffen und sekundären Metaboliten dienen. Außerdem sind sie in den programmierten Zelltod involviert und können auch Proteine akkumulieren, die bei der Keimung als Quelle für Aminosäuren verwendet werden können (JOLLIFFE *et al.*, 2005).

Der Transport innerhalb des sekretorischen Systems verläuft in Pflanzenzellen sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung durch das Endomembransystem. So verläuft der biosynthetische Weg (anterograd) vom ER zur Plasmamembran oder zur Vakuole und der endocytotische Weg (retrograd) genau entgegengesetzt (siehe Abb. 8). Im Mittelpunkt steht der Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), wo sich entscheidet, ob ein Protein zur Zelloberfläche transportiert und damit sekretiert oder zum endosomalen Membransystem, also den Vakuolen, transportiert wird.

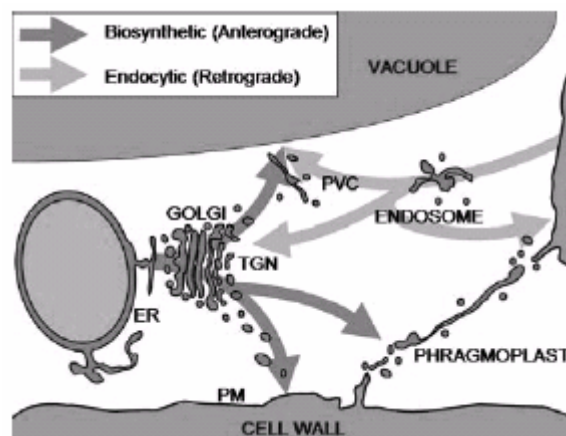


Abb. 8: Transportwege im Endomembransystem von Pflanzenzellen (nach SANDERFOOT & RAIKHEL, 2003)

ER = endoplasmatisches Reticulum; PM = Plasmamembran; PVC = prävakuoläres Kompartiment; TGN = Trans-Golgi-Netzwerk

Die Polypeptide werden in Transportvesikeln, die von einem Kompartiment abgeschnürt werden, eingeschlossen und in eine bestimmte Richtung transportiert (BONIFACINO & GLICK, 2004). Sobald das Zielkompartiment erreicht ist, verschmelzen die Vesikel mit diesem und setzen so die Proteine frei. Die Auswahl von Proteinen für einen bestimmten Vesikeltyp setzt die Erkennung

der Proteine durch spezifische Rezeptoren, wie z.B. vakuoläre Sorting-Rezeptoren für die Aufnahme in Vesikel, die zur Vakuole transportiert werden, voraus. Aus diesem Grund müssen vakuoläre Proteine nicht nur Signalpeptide zur Translokation durch die ER-Membran besitzen sondern zusätzliche Sortierungssignale enthalten, die den Transport in die Vakuole ermöglichen. In Pflanzen gibt es im Gegensatz zu anderen Eukaryoten, die ein bis zwei vakuoläre Sorting-Rezeptoren besitzen, mehrere dieser Rezeptoren. Nach MASCLAUX *et al.* (2005) ist dies vermutlich auf das Vorhandensein zweier verschiedener Vakuolen, der lytischen und der Protein-Speicher-Vakuole, zurückzuführen. Die vakuolären Sortierungssignale (VSS), die von den entsprechenden Rezeptoren erkannt werden, werden in drei Gruppen unterteilt: C-terminale VSS (ctVSS), Sequenz-spezifische VSS (ssVSS) und physikalische Struktur VSS (JOLLIFFE *et al.*, 2005). Nachdem Proteine vom ER in den Golgi-Komplex eingetreten sind, können sie über zwei verschiedene Wege weiter transportiert werden. So können sie entweder über das prävakuoläre Kompartiment zur lytischen Vakuole oder über einen noch nicht vollständig bekannten Weg zur Protein-Speicher-Vakuole gelangen. Der Weg zur lytischen Vakuole wird durch den Rezeptor BP80 (Bindeprotein von 80 kDa) vermittelt (KIRSCH *et al.*, 1994), der den Clathrin-Adapter-Komplex bindet und so zur Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln führt (HAPPEL *et al.*, 2004). BP80 erkennt z.B. das NPIR-Motiv am N-Terminus der Thiolprotease Aleurain aus Gerste und des Sporamins aus Süßkartoffel. Ob auch am Transport in die Protein-Speicher-Vakuole Rezeptoren beteiligt sind, ist bislang noch nicht geklärt. Sicher scheint aber zu sein, dass bei diesem Weg Vesikel ohne Clathrinhülle, sogenannte „dense vesicle“, zum Einsatz kommen (HINZ *et al.*, 1999). Manche Proteine werden auch direkt vom ER in PAC („precursor-accumulating“-) Vesikeln am Golgi-Komplex vorbei zur Protein-Speicher-Vakuole geschleust (HARA-NISHIMURA *et al.*, 1998). Das Modell in Abbildung 9 fasst die drei möglichen Protein-Transportwege zu beiden Vakuolen zusammen.

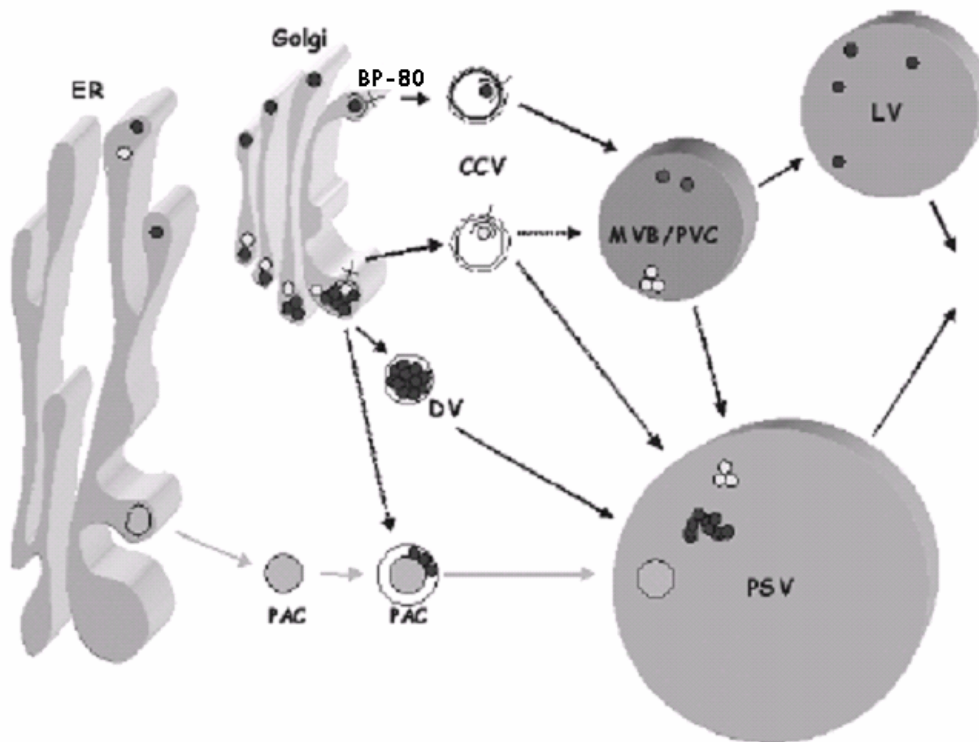


Abb. 9: Modell des Protein-Transports zu den Vakuolen (nach JOLLIFFE *et al.*, 2005)

Proteine können vom Golgi-Komplex über den BP80-vermittelten Weg mit Hilfe von Clathrin-umhüllten Vesikeln zur lysischen Vakuole transportiert werden. Der zweite Weg führt über hüllfreie Vesikel („dense vesicle“) vom Golgi zur Protein-Speicher-Vakuole. Beim dritten Transportweg werden die Proteine direkt vom ER aus in PAC-Vesikeln zur Protein-Speicher-Vakuole transportiert.

ER = endoplasmatisches Reticulum, CCV = Clathrin-umhüllter Vesikel, DV = „dense vesicle“, PAC = „precursor-accumulating“ Vesikel, PVC = prävakuoläre Kompartiment, LV = lysische Vakuole, PSV = Protein-Speicher-Vakuole

#### 1.4.1 Methoden für Lokalisationsstudien

In den letzten Jahren haben Untersuchungen von Protein-Transportwegen und die Identifizierung von Sortierungssignalen stark an Bedeutung gewonnen. Die Entwicklung von Techniken zur transienten Expression von rekombinanten Proteinen in pflanzlichen Protoplasten haben diese Arbeiten deutlich erleichtert. Auf diese Weise können Transportprozesse *in vivo* beobachtet werden, ohne die Möglichkeit der Manipulation durch den Einsatz von Drogen, Änderung der Kulturbedingungen oder Mutationen zu verlieren (DENECKE & VITALE, 1995). So kann z.B. durch den Zusatz der Droge Wortmannin zum Kulturmedium der vakuoläre Transport von Proteinen unterdrückt werden (PIMPL *et al.*, 2003). Wortmannin inhibiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Aktivität in menschlichen Zellen (THELEN *et al.*, 1994) und die Phosphatidylinositol-4-Kinase-Aktivität in Pflanzenzellen, die am Proteintransport zur Vakuole beteiligt sind. DASILVA *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Wortmannin das BP80-Recycling vom

prävakuolären Kompartiment inhibiert und somit den Protein-Transport in die Vakuole unterbindet. Darüber hinaus konnten die Autoren beobachten, dass auch eine erhöhte Anzahl von Molekülen, die die trans-Membrandomäne und den cytosolischen Teil des BP80 beinhalten, zur Blockade dieses Transportweges zur Vakuole führen kann. Eine solche Blockade des Transports in die Vakuole führt zu einer Sekretion des entsprechenden Proteins.

Ein weiterer Vorteil der Arbeit mit Protoplasten besteht in der Möglichkeit, die Sekretion von Proteinen, seien es natürlich sekretierte Proteine oder Proteine, die durch Beeinflussung des Transportweges, wie oben beschrieben, aus der Zelle geschleust werden, quantitativ zu untersuchen. Dies ist möglich, da die Zellen sich während der Kultivierung nicht teilen und auch nicht, wie humane Zellen an Oberflächen binden. Darüber hinaus können die Zellen durch ihr Aufschwimmen leicht vom Medium getrennt werden, das ohne Verunreinigung durch Protoplasten unter den Zellen abgesogen werden kann (DENECKE & VITALE, 1995).

Für die funktionelle Analyse von Sortierungssignalen ist, laut DENECKE und VITALE (1995) die Verwendung eines Modell-Systems notwendig. So kann der Transport eines rekombinanten Proteins in Zellen, die dieses normalerweise nicht produzieren, untersucht werden. Dies ist durch das Einbringen von chimären Genen (die die Signalsequenz und die Sequenz des rekombinanten Proteins beinhalten) in Zellen einer fremden Pflanzenspezies oder eines anderen Gewebetyps möglich, da mit der Detektionsmethode lediglich das rekombinante Protein nachgewiesen wird. Ein Beispiel für ein solches Protein ist die  $\alpha$ -Amylase aus Gerste, die aufgrund ihrer hohen Stabilität gut als Markerprotein verwendet werden kann und bereits von mehreren Autoren zur Untersuchung des Sekretionsweges von Proteinen und von Signalsequenzen eingesetzt wurde (z.B. LEBORGNE-CASTEL *et al.*, 1999; PHILLIPSON *et al.*, 2001; DASILVA *et al.*, 2005). Die  $\alpha$ -Amylase ist ein natürlich sekretiertes Protein und kann durch eine sensitive und quantitative colorimetrische Methode nachgewiesen werden. Wie z.B. PIMPL *et al.* (2003) zeigten, kann das Protein mit Sortierungssignalen anderer Proteine gekoppelt werden ohne seine Aktivität zu verlieren. Ein weiteres Markerprotein stellt das *grün-fluoreszierende Protein* (GFP) aus Quallen dar (HANSON & KÖHLER, 2001). Wird es ohne Fusion an ein anderes Polypeptid exprimiert, so findet man es sowohl im Cytoplasma als auch im Kern, da es aufgrund seiner geringen Größe durch die Kernporen in den Kern vordringen kann. Das GFP kann in intaktem Gewebe exprimiert und betrachtet werden, ohne den Zusatz jeglicher Reagenzien, die das Gewebe bzw. die Zelle zerstören könnten. Es konnten sowohl N- als auch C-terminale Fusionen von GFP mit anderen Polypeptiden hergestellt und sowohl zur stabilen als auch zur transienten Expression in

Pflanzen verwendet werden. So wurden bereits Konstrukte zur Markierung der Zellwand, der Chloroplasten, des Zellkerns und des ERs hergestellt und erfolgreich exprimiert (VON ARNIM *et al.*, 1998; SCOTT *et al.*, 1999).

Neben den Protoplasten, ist auch die Zwiebelepidermis ein nützliches Objekt für die transiente Expression von chimären Genen zur Untersuchung der Funktion von Signalsequenzen. Besonders das äußerst klare Cytoplasma und ihre Zusammensetzung aus nur einer Schicht lebender Zellen, stellen einen Vorteil für die Lokalisation von Fusionsproteinen dar, z.B. mit GFP (HANSON & KÖHLER, 2001).

## 1.5 Zusammenfassende Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das Wirkpotential von Knoblauchsaft gegen verschiedene phytopathogene Organismen *in vivo* untersucht werden. Dabei sollten sowohl Pflanzen- als auch Samenbehandlungen getestet werden. Hierzu sollten die Pathosysteme *Phytophthora infestans* / *Solanum lycopersicum* L.<sup>1</sup>, *Alternaria solani* / *Solanum lycopersicum* L. und *Alternaria* spp. / *Daucus carota* verwendet werden. Im Freiland sollte die Wirkung des Saftes auf Kartoffelpathogene geprüft werden.

Darüber hinaus sollte der bzw. sollten die Wirkmechanismen des Knoblauchs bzw. des Allicins untersucht werden. Es sollten sowohl mit *Phytophthora infestans* *in vitro* und *in vivo* Versuche als auch Untersuchungen mit dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden. Dabei sollte auch eine mögliche Apoptose-Induktion in Betracht gezogen werden.

Des Weiteren sollte die Möglichkeit geprüft werden, die Alliinase aus Knoblauch in fremden Organismen bzw. Pflanzenspezies zu synthetisieren.

Um eine Vorhersage machen zu können, in welchem Zellkompartiment die transgene Alliinase zu erwarten sei, sollten zusätzliche Konstrukte transient in Tabak-Protoplasten und Zwiebelepidermiszellen exprimiert werden. Mit diesem Ansatz sollten auch Hinweise auf die Funktion von Sequenzen des Alliinasegens gewonnen werden, die von Computer-Programmen und von VAN DAMME *et al.* (1992) als vakuoläre Signalsequenzen vorhergesagt worden waren (siehe auch Anhang 1 und 2).

---

<sup>1</sup> Synonyme: *Lycopersicon esculentum*, *Solanum esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung (29:1)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Agar	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Agarose	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
Allicin (in 60% Methanol + 0,1% Ameisensäure)	<i>Axxora Deutschland GmbH, Grünberg</i>
Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Ammoniumthiocyanat	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Ampicillin	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Anti-Alliinase-Antikörper	<i>AG Prof. Peumans, Universiteit Leuven (NL)</i>
Anti-DIG-Antikörper (an alkal. Phosphatase gekoppelt)	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Anti-Kaninchen-Antikörper (an HR-Peroxidase gekoppelt)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
1-Brom-3-Chlorpropan	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
BSA Fraction V (Rinderserum Albumin)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Calciumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Carbenicillin	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Chloralhydrat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Complement supplement mixture (CSM)	<i>Bio101 Inc., Vista CA (USA)</i>
dATP	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
DEPC	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
DIG Easy Hyb-Puffer	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
DIG-markierte NTP	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>

---

<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Dithiotreitol (DTT)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
dNTP-Mix (10 mM)	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure))	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Ethidiumbromid	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Fleisch-Extrakt	<i>Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe</i>
Folin-Ciocalteus-Phenol Reagenz	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Formaldehyd (37%)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Formamid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Gamborg B5 Medium	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Glucose	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Glutathion, oxidiert	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Glutathion, reduziert	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Glycerin	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Glycin	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Guanidinthiocyanat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Harnstoff (Urea)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Hefe-Extrakt	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
HEPES	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
4-Hydroxybenzoesäurebutylester	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Kaliumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Kalium-Natrium-Tartrat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>

---

Kanamycinsulfat	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Lithiumchlorid ( $\text{LiCl}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
MES (2-[N-morpholino]-ethansulfonsäure)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Methanol	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Methanol (HPLC grade)	<i>VWR Intern. GmbH, Darmstadt</i>
Milchsäure	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
MS-Salze	<i>Duchefa Biochemie, Haarlem (NL)</i>
Natriumacetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Natriumcitrat ( $\text{Na-Citrat} \times \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Natriumhypochlorid-Lösung ( $\text{NaOCl}$ )	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Ortho-Phosphorsäure (85%ig) ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
p-Coumarsäure	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Pepton	<i>GibcoBRL, Paisley (Schottland)</i>
Phytagar	<i>GibcoBRL, Paisley (Schottland)</i>
Ponceau S-Färbelösung	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Potatodextrosebroth (PDB)	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>

Pyridoxal-5'-Phosphat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Rifampicin	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Rubidiumchlorid (RbCl)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Saccharose	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Säurefuchsin	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Silwet L-77	<i>Union Carbide Chemicals GmbH, Düsseldorf</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Triethanolamin-Hydrochlorid (TEA-HCl)	<i>Aldrich Chemical Company, Milwaukee (USA)</i>
Tris	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Trockenmilchpulver (Marvel, dried skimmed milk)	<i>Premier Intern. Foods Ltd., (UK)</i>
Trypton	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Tween 20	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
2-Vinylpyridin	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Wasser (HPLC grade )	<i>VWR Intern. GmbH, Darmstadt</i>
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Yeast nitrogene base without amino acids (YNB)	<i>Formedium LTD, Norwich (UK)</i>
Zwittergent 3-14 (Sulfobetain SB14)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
β-Nicotinamidadeninucleotid, reduz. (NADH)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

### Autoklaven

Tecnoclav	<i>Tecnomara GmbH, Fernwald</i>
Autoklav	<i>Tecnomara AG, Zürich</i>
Autoklav 3870 ELV	<i>Tuttnauer Europe, Breda (NL)</i>

### Blotting-Zubehör

Filterpapier	<i>Schleicher &amp; Schuell GmbH, Dassel</i>
--------------	--

Hybridisierungsöfen	<i>Amersham Life Science, Buckinghamshire (UK)</i>
Nitrozellulose-Membran	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Nylon-Membran	<i>PerkinElmer Inc., Waltham MA (USA)</i>
pH-Meter MP 220	<i>Mettler-Toledo GmbH, Giessen</i>
Semidry-Blotting-Gerät (Multiphor II)	<i>Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg</i>
Elektrophorese-Zubehör	
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	<i>MWG Biotech AG, Ebersberg</i>
Geldokumentationskamera	<i>Polaroid Corp., Waltham MA (USA)</i>
Spannungsgeber (Mini Electrophoresis Power Supply E143)	<i>Consort, Turnhout (B)</i>
2UV <sup>TM</sup> Transilluminator	<i>Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge (UK)</i>
Vertikal-Elektrophorese-Kammer (Mighty Small System S250)	<i>Hoefler Inc., San Francisco (USA)</i>

### **Mikroskope und Zubehör**

Digitalkamera für Mikroskopie (Digital Camera KY-F75U)	<i>JVC Deutschland GmbH, Friedberg</i>
Konfokales Laser-Scan-Mikroskop (TCS SP1)	<i>Leica GmbH, Wetzlar</i>
Licht-Mikroskop (DM RBE)	<i>Leica GmbH, Wetzlar</i>
Objektive für Laser-Scan- und Licht-Mikroskop	<i>Leica GmbH, Wetzlar</i>

### **Photometer**

Spektrophotometer DU® 530 (zur OD <sub>600</sub> Bestimmung)	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>
Spektrophotometer DU® 800 (zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen und für Enzymtests)	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>
Spektrophotometer DU® 7500 (zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen)	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>

### **Verbrauchsmaterial**

Dialyse-Schlauch (ZelluTrans 12)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Elektroporationsküvetten	<i>BioRad Laboratories GmbH, München</i>
Filtriereinheit „Steriflip“, 50 ml	<i>Millipore Corp., Billerica (USA)</i>
Halbmikro-Küvetten	<i>Brand GmbH + Co KG, Wertheim</i>
Micropore <sup>TM</sup> -Band	<i>3M Health Care, Neuss</i>

Parafilm™	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Petrischale, rund 35/10 mm	<i>Greiner bio-one GmbH, Krefeld</i>
Petrischale, rund 60/15 mm	<i>Greiner bio-one GmbH, Krefeld</i>
Petrischale, rund 94/16 mm	<i>Greiner bio-one GmbH, Krefeld</i>
Petrischale, quadratisch 120/120 mm	<i>Greiner bio-one GmbH, Krefeld</i>
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Verbandsmull	<i>Paul Hartmann AG, Heidenheim</i>
Zentrifugenröhrchen (konisch, 15 und 50 ml)	<i>Greiner bio-one GmbH, Krefeld</i>
Zentrifugenröhrchen (15 ml, glasklar)	<i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i>

### **Zentrifugen**

J2-21 Centrifuge	<i>Beckman Coulter GmbH, Krefeld</i>
Kühlzentrifuge 5417R	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Megafuge 1.OR	<i>Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf</i>
Tischzentrifuge 5415C	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

### **Sonstiges**

Einmachgläser	<i>J. Weck GmbH u. Co. KG, Wehr</i>
Elektroporator (MicroPluser)	<i>BioRad Laboratories GmbH, München</i>
Entsafter	<i>Turmix AG, Zürich (CH)</i>
Inkubationsschränke	<i>Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach</i>
Inkubatoren	<i>Sanyo-Gallenkamp, Breda (NL) und New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen</i>
Pipetten (bis 5000 µl)	<i>Gilson Inc., Middleton WI (USA) und Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pflanzenlampen (OSRAM fluora 65W/77R + Philips TLD 58W/865)	<i>OSRAM GmbH, München</i>
Thermocycler PTC-200	<i>Philips GmbH, Hamburg</i>
	<i>MJ Research</i>
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Wasseraufbereitungsanlage	<i>Millipore Corp., Billerica (USA)</i>
Diaphragm Vacuum Pump	<i>Vaccubrand GmbH &amp; Co., Wertheim</i>

## 2.3 Kits und Enzyme

Accu Taq™ LA DNA Polymerase	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>
Alkalische Phosphatase (Calf Intestine)	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
Cereal $\alpha$ -amylase assay	<i>Megazyme, Bray (IRL)</i>
DNase (RNase-frei)	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
FastPlasmid™ Mini	<i>Eppendorf AG; Hamburg</i>
Glutathion-Reduktase	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>
Jetstar 2.0 (Maxi)	<i>Genomed GmbH; Löhne</i>
L-Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>
Pektinase von <i>Rhizopus spec.</i>	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>
peqGold Gel Pure Kit	<i>PeqLab Biotechnologie GmbH</i>
Perfectprep® Gel Cleanup	<i>Eppendorf AG; Hamburg</i>
<i>PfuTurbo</i> ® DNA Polymerase	<i>Stratagene; Heidelberg</i>
pGEM-TEasy Vector Systems (Kit)	<i>Promega GmbH; Mannheim</i>
Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase Kit	<i>BioCat GmbH; Heidelberg</i>
Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	<i>Invitrogen GmbH; Karlsruhe</i>
Red Taq™ Ready Mix™ PCR Reaction Mix	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
RNase-Inhibitor	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
SP6-RNA-Polymerase	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
SR-FLICA™ Poly Caspase Apoptosis Detection Kit	<i>Axxora Deutschland GmbH, Grünberg</i>
T4-DNA-Ligase	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
Taq DNA Polymerase (recombinant)	<i>Fermentas GmbH; St. Leon-Rot</i>
Wizard® Plus SV Minipreps	<i>Promega GmbH; Mannheim</i>
Zellulase von <i>T. viride</i>	<i>Sigma Aldrich GmbH; München</i>

Allgemeine Bezeichnung	„Fermentas“ Bezeichnung	Erkennungssequenz	Puffer (für 100% Aktivität)	Temperatur
<i>Hind</i> III		5'- AAGCTT -3'	R	37°C
<i>Nco</i> I		5'- CCATGG -3'	Tango™	37°C
<i>Not</i> I		5'- GCGGCCGC -3'	O	37°C
<i>Pag</i> I	<i>BspH</i> I	5'- TCATGA -3'	O	37°C
<i>Pst</i> I		5'- CTGCAG -3'	O	37°C
<i>Sal</i> I		5'- GTCGAC -3'	O	37°C

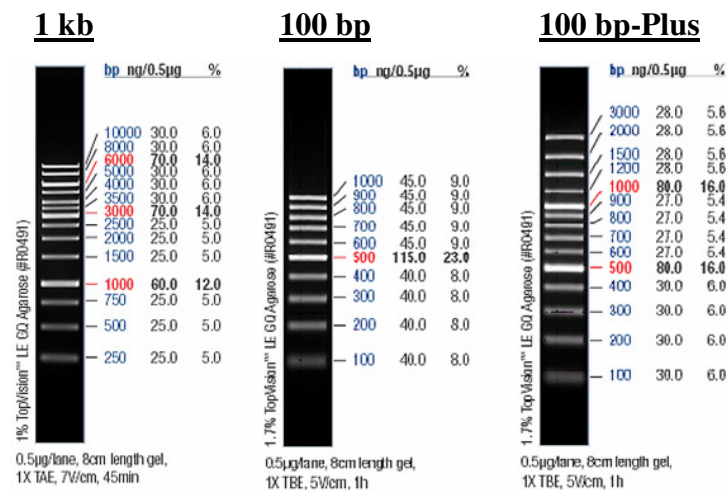
Tab. 1: Verwendete Restriktionsendonukleasen

Wenn sich kein Eintrag in der zweiten Spalte befindet, so entspricht die Bezeichnung der Firma Fermentas der allgemeinen Nomenklatur.

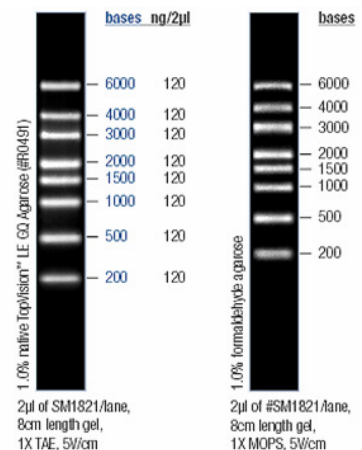
## 2.4 Größenmarker

Sämtliche Größenmarker wurden von Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) bezogen.

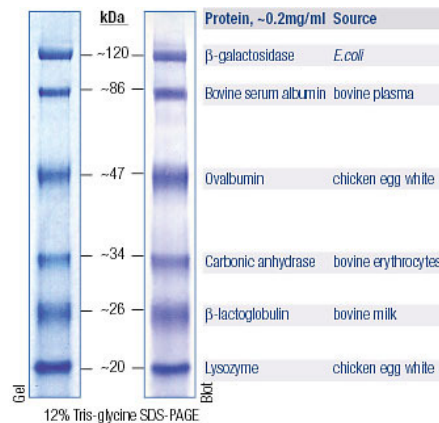
### DNA-Marker



### RNA-Marker



## Protein-Marker



## 2.5 Mikroorganismen

### 2.5.1 *Escherichia coli*

DH5α

F<sup>-</sup> φ80dlacZΔM15 (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17/r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>* *phoA supE44λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1* (HANAHAH, 1983).

Dieser Stamm wurde zur Vermehrung von Plasmiden verwendet.

K-12

Der prototrophe *E. coli* K-12 Wildtyp-Stamm wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie (Biologie IV) der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt (vgl. CURTIS *et al.*, 2004) und wurde im Bioassay zur Untersuchung der Wirksamkeit des Knoblauchsaftees genutzt.

### 2.5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

GV3101 C58C1 Rif<sup>r</sup> pMP90RK (VAN LAREBEKE *et al.*, 1974; KONCZ & SCHELL, 1986)

Dieser Agrobakterien-Stamm enthält das Plasmid pMP90RK, ein Derivat des Ti-Plasmids, das als Helferplasmid die Übertragung von DNA aus binären Vektoren in Pflanzen ermöglicht. Neben der Virulenz-Region (*vir*) beinhaltet es Resistenzgene für Kanamycin und Gentamycin sowie die für die Konjugation notwendigen Mobilisierungs- (*mob*) und Transferfunktionen (*tra*) (KONCZ & SCHELL, 1986).

### 2.5.3 *Saccharomyces cerevisiae*

#### RS 453

*MATa/MAT $\alpha$  ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3* (HELLMUTH *et al.*, 1998)

Der Stamm wurde sowohl zur transgenen Expression der Alliinase als auch für die Untersuchungen zur möglichen proapoptotischen Wirkung des Knoblauchs verwendet.

#### SS 330

*MATa ade2-101 ura3-52 his3 $\Delta$ 200 tyr1* (RUBY *et al.*, 1993)

Dieser Hefestamm wurde ebenfalls für Studien der potentiellen proapoptotischen Wirkung des Knoblauchs genutzt.

### 2.5.4 *Phytophthora infestans*

Für Infektionsversuche mit dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel bzw. Braunfäule an Tomate wurde der *Phytophthora infestans*-Stamm 10/88 verwendet, der freundlicherweise von Bayer CropScience zur Verfügung gestellt worden war.

### 2.5.5 *Alternaria solani*

Der für Infektionsversuche verwendete *Alternaria solani* Stamm Nr. 297 wurde freundlicherweise von Syngenta Crop Protection Münchwilen AG zur Verfügung gestellt. Der Stamm wurde 1985 in Saint-Aubin (CH) von Kartoffel isoliert.

## 2.6 Pflanzenmaterial

### 2.6.1 Tomatenpflanzen

In den durchgeführten Infektionsversuchen wurden drei Wochen alte Pflanzen der Buschtomatensorte **Hoffmanns Rentita**® (Firma Schmitz & Laux; Hilden) eingesetzt.

### 2.6.2 *Arabidopsis*-Pflanzen

Zur Expression der Alliinase wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen der unten aufgeführten Ökotypen verwendet:

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Akzession „**Columbia**“ N1093 (Col-0)

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Akzession „**Landsberg erecta**“ Wildtyp (Ler-0).

### 2.6.3 Tabakpflanzen

Für die Herstellung von Protoplasten zur Transformation wurden Tabakpflanzen der Sorte **Petit Havana SR1** (MALIGA *et al.*, 1973) steril angezogen.

## 2.7 Nukleinsäuren

### 2.7.1 Vektoren

Vektor-Bezeichnung	Beschreibung	Selektionsmarker	Referenz
pGEM®-TEasy	TA-Klonierungsvektor Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	Promega GmbH, Mannheim
pAMY	Binärer Vektor $\alpha$ -Amylase unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und 3'-Terminator in pUC18	Ampicillin (für Bakterien)	CROFTS <i>et al.</i> 1999
pGFP	Binärer Vektor GFP unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und 3'-Terminator	Ampicillin (für Bakterien)	DASILVA <i>et al.</i> 2005
pCHF1	Binärer Vektor beinhaltet CaMV 35S- Promotor und RBCS- Terminator aus Erbse	Spectinomycin (für Bakterien) Gentamycin (für Pflanzen)	JARVIS <i>et al.</i> 1998
pFL61	Hefe-Expressionsvektor beinhaltet Phosphoglyceratkinase- Promotor und den dazugehörigen Terminator	Ampicillin (für Bakterien)  Uracil (für Hefe)	MINET <i>et al.</i> 1992

Tab. 2: Verwendete Plasmide

## 2.7.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz	Orientierung
Alfwd	<i>Sal</i> I	5'- gtcgacaagatgacatggactatgaagg -3'	Forward
Alrev	<i>Pst</i> I	5'- ctgcagttaaatgaaaggacgacgggag -3'	Reverse
Al+TS2/SalI	<i>Sal</i> I	5'- gtcgacatggaggagtcttac -3'	Forward
Al_Ende		5'- caaagaggaagactcctctc -3'	Forward
Al_Sondefwd		5'- ggctctcctaaatgcgagtg -3'	Forward
Al_Sonderev		5'- agcagaccttcggggttatta -3'	Reverse
TS2fwd_NcoI	<i>Nco</i> I	5'- ttaattagccatggtggagtcttacaaaaaattg -3'	Forward
TSfwd_NcoI	<i>Nco</i> I	5'- tggatatatccatgggatctgcttagtg -3'	Forward
TS/2rev+Amy		5'- gttgaagccctgaaaggactgtgaattagacatgat aatgcatgc -3'	Forward + Reverse
Amy_fwd		5'- caagtctctttcagggettcaactgg -3'	Forward
PUCOFmod	<i>Hind</i> III	5'- cggctcgtatggtgtggaattg -3'	Reverse
M13-Primer fwd (-40)		5'- gtttcccagtcacgac -3'	Forward
M13-Primer rev		5'- aacagctatgaccatga -3'	Reverse
M13 forward (-21) (zur Sequenzierung)		5'- tgtaaacgacggccagt -3'	Forward
M13 rev (zur Sequenzierung)		5'- caggaaacagctatgacc -3'	Reverse
Alipro-AS		5'- cgcttgaacatattattgttaacaagtgaattaga catgataatgcatgc -3'	Reverse
Aliproamy-S		5'- cacttgtaacaataataatggttcaagcgcaag tcctcttcagggettcaactgg -3'	Forward
AliproGFP-S		5'- cacttgtaacaataataatggttcaagcgcaagatga gtaaaggagaagaacttttactgga -3'	Forward
PUCOF	<i>Hind</i> III	5'- cggctcgtatggtgtggaattg -3'	Reverse
35SProm	<i>Nco</i> I	5'- ccactatccttcgaaga -3'	Forward

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide

## 2.8 Medien

Alle Medien wurden mit ultrafiltriertem Wasser (Aufreinigungsanlage von Millipore GmbH, Eschborn) (H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) angesetzt und durch Autoklavieren (121°C, 1 bar, 15-20 min) sterilisiert.

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengen auf ein Endvolumen von 1 l.

### 2.8.1 Bakterien-Medien

**LB-Medium** (zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen bei 37°C):

10 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl

Zur Herstellung von Festmedium wurden 15 g l<sup>-1</sup> Agar zugegeben.

Sollte das Medium der Selektion transformierter Bakterien dienen, wurden Antibiotika in den benötigten Konzentrationen hinzugefügt (→ 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin (pGEM-TEasy; pAMY, pGFP, pFL61) oder 100 µg ml<sup>-1</sup> Spectinomycin (pCHF1)).

**YEB-Medium** (zur Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*-Stämmen):

5 g	Fleisch-Extrakt
1 g	Hefe-Extrakt
5 g	Pepton
5 g	Saccharose
0,5 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O

*pH 7,4 mit 5M KOH eingestellt*

Zur Herstellung von Festmedium wurden dem Medium 15 g l<sup>-1</sup> Agar zugegeben.

Zur selektiven Bakterienanzucht wurden dem Medium, den Selektionsmarkern entsprechende, Antibiotika zugesetzt (→ 50 µg ml<sup>-1</sup> Kanamycin, 100 µg ml<sup>-1</sup> Rifampicin, 100 µg ml<sup>-1</sup> Spectinomycin (pCHF1)).

### 2.8.2 Hefe-Medien

**YPD-Medium** (zur Kultivierung von *S. cerevisiae* Wildtyp-Stämmen):

10 g	Hefe-Extrakt
20 g	Trypton
20 g	Glucose

Zur Herstellung von Festmedium wurden dem Medium 20 g l<sup>-1</sup> Agar zugegeben.

**YNBD-Medium ohne Uracil** (zur Selektion transformierter *S. cerevisiae*):

1,7 g	YNB
5 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
20 g	Glucose
0,7 g	CSM –Ura (Complement supplement mixture without Uracil)

*pH 7,0 mit 1M KOH eingestellt*

Zur Herstellung von Festmedium wurden dem Medium 18 g l<sup>-1</sup> Agar zugegeben.

### 2.8.3 Pilz- bzw. Oomyceten-Medien

**Tomatensaft-Agar (TSA)** (zur Kultivierung von *P. infestans* und *A. solani*):

3 g	CaCO <sub>3</sub>
12 g	PDB
20 g	Agar
200 ml	Tomatensaft (Fa. Kings)

### 2.8.4 Pflanzen-Medien

**MS-Medium** (zur sterilen Pflanzenanzucht):

4,6 g	MS-Salze
20 g	Saccharose

*pH 5,7 mit 1M KOH eingestellt*

Zur Herstellung von Festmedium wurden dem Medium 6 g l<sup>-1</sup> Phytagar zugegeben.

## 2.9 Lösungen und Puffer

### 2.9.1 Für die Glutathion-Messung

**Natriumphosphat-Puffer (Na-P-Puffer) nach ANDERSON (1985)**

A: 143 mM (19,73 g l<sup>-1</sup>) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

B: 143 mM (20,3 g l<sup>-1</sup>) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

A und B wurden im Verhältnis 1 : 5,25 gemischt und 6,3 mM (2,35 g l<sup>-1</sup>) EDTA hinzugefügt.

*pH 7,5 eingestellt*

### 2.9.2 Für die RNA-Extraktion

#### Extraktionspuffer

100 mM	LiCl
100 mM	Tris
100 mM	EDTA
1% (w/v)	SDS

*pH 8,0 mit HCl eingestellt*

#### TRI-Reagenz

0,4 M	Ammoniumthiocyanat
0,8 M	Guanidinthiocyanat
0,1 M	Natriumacetat
5% (v/v)	Glycerin
38% (v/v)	saures Phenol

*pH 5,0 mit Essigsäure eingestellt*

#### RNase-freies Wasser (DEPC-behandelt)

Zur Herstellung RNase-freien Wassers wurde 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit 100 µl DEPC versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Autoklavieren sterilisiert.

### 2.9.3 Für die DNA-Extraktion

#### Lyse-Puffer

100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
10 mM	EDTA
100 mM	NaCl
2% (w/v)	SDS

#### TE-Puffer

100 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

### 2.9.4 Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen

#### TFBI-Lösung

30 mM	Kaliumacetat
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15% (v/v)	Glycerin

*pH 5,8 mit HCl eingestellt*

#### TFBII-Lösung

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,5 mM	RbCl
15% (v/v)	Glycerin

*pH 6,8 mit NaOH eingestellt*

Beide Lösungen wurden durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

### 2.9.5 Für die Agarose-Gelelektrophorese

#### DNA-Ladepuffer (10x)

0,5% (w/v)	Bromphenolblau
50% (v/v)	Glycerin
0,1 M	EDTA

#### TAE-Puffer (10x)

0,4 M	Tris
0,2 M	Natriumacetat
10 mM	EDTA (pH 8,2)

#### Ethidiumbromid-Stammlösung

5 mg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### 2.9.6 Zur Transformation von *A. thaliana*

#### Infiltrationsmedium

5% (w/v)	Saccharose
400 µl	Silwet L-77

### 2.9.7 Zur Transformation von Tabak-Protoplasten

#### TEX-Puffer

500 mg l <sup>-1</sup>	MES
3,1 g l <sup>-1</sup>	Gamborg B5 Medium
136 g l <sup>-1</sup>	Saccharose
750 mg l <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
250 mg l <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>

pH 5,7 mit KOH eingestellt

#### Elektroporationspuffer

2,4 g l <sup>-1</sup>	HEPES
136 g l <sup>-1</sup>	Saccharose
600 mg l <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
6 g l <sup>-1</sup>	KCl

pH 7,2 mit KOH eingestellt

Beide Lösungen wurden steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### Lyse-Puffer (10x)

2%	Macerozym R10 (Pektinase)
2%	Zellulase

in 35 ml TEX-Puffer

Die Lösung wurde nach 45 min Rühren für 15 min bei 5 000 x g (Megafuge 1.OR) zentrifugiert und anschließend steriltriftriert. Dann wurde der fertige 10x Lyse-Puffer in 50 ml-Falcon®-GefäÙe aliquotiert, so dass er, vor der Verwendung bei der Protoplasten-Gewinnung, in diesen GefäÙen 1:10 mit TEX-Puffer verdünnt werden konnte. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

### **Amylase-Extraktionspuffer**

50 mM Maleinsäure  
 80 mM NaOH  
 50 mM NaCl  
 2 mM CaCl<sub>2</sub>  
 0,005 % (w/v) Natriumazid  
*pH 5,2 mit HCl eingestellt*

## **2.9.8 Für die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

### **RNA-Ladepuffer**

720 µl Formamid  
 260 µl Formaldehyd (37%)  
 160 µl MOPS (10x)  
 100 µl Ethidiumbromid  
 100 µl DEPC-behandeltes Wasser (steril)  
 80 µl Glycerol (steril)  
 80 µl wässrige Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)

Bei den angegebenen Volumina handelt es sich um die Gesamt-Volumina. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei -20°C.

### **MOPS (10x)**

0,2 M MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure)  
 0,05 M Na-Acetat  
 0,01 M Na-EDTA  
*pH 7,0 mit NaOH eingestellt und autoklaviert*

### 2.9.9 Für die Northern Blot Analyse

#### SSC (20x)

3 M NaCl  
 3 M Na-Citrat  
*pH 7,0 mit NaOH eingestellt*

#### Waschpuffer (10x)

1 M Maleinsäure  
 1,5 M NaCl  
 1,95 M NaOH  
*pH 7,5 mit NaOH eingestellt*

Beide Puffer wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

#### Blocking-Reagenz (10x)

Das Blocking-Pulver wurde in 500 ml 1x Waschpuffer gelöst und autoklaviert.

Zur Herstellung von 1x Blocking-Reagenz wurde die 10-fach konzentrierte Lösung mit 1x Waschpuffer verdünnt.

### 2.9.10 Zur Proteinextraktion

#### Laemmli-Puffer (2x)

2,5 ml 0,5M Tris-HCl (pH 6,8)  
 2 ml Glycerin  
 4 ml 10% SDS (w/v)  
 0,4 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 2 mg Bromphenolblau  
 ad 10 ml mit  $H_2O_{\text{bidest.}}$

#### Phosphat-Puffer (10x; 600 mM)

35,4 g  $KH_2PO_4$   
 72,5 g  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$   
*pH 7,0 eingestellt*  
 Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

#### Alliinase-Vollpuffer

100 ml  $l^{-1}$  Phosphat-Puffer (10x; pH 7,0)  
 100g  $l^{-1}$  Saccharose  
 10 g  $l^{-1}$  NaCl  
 26,5 mg  $l^{-1}$  Pyridoxal-5-Phosphat  
 200 mg  $l^{-1}$  Natriumazid

### 2.9.11 Für die Proteinmengenbestimmung nach LOWRY *et al.*

#### Lowry-Lösung A

100 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
20 g l<sup>-1</sup> NaOH

#### Lowry-Lösung B

10 g l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O

#### Lowry-Lösung C

20 g l<sup>-1</sup> Na-K-Tartrat

#### Lowry-Gebrauchslösung

20 VT Lowry-Lösung A  
1 VT Lowry-Lösung B  
1 VT Lowry-Lösung C

#### Folin-Gebrauchslösung

1 VT Folin-Ciocalteus-Reagenz  
10 VT H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### 2.9.12 Für die Western Blot Analyse

#### Laufpuffer

25 mM Tris  
0,19 % Glycin  
0,1 % SDS

#### Blotting-Puffer

15,6 mM Tris  
120 mM Glycin  
20 % Methanol

#### PBS (phosphate buffered saline; 10x)

87 g l<sup>-1</sup> NaCl  
22,5 g l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
2 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*pH 7,4 mit NaOH eingestellt*

#### Blockierungslösung

5 % Trockenmilchpulver  
in 1x PBS + 0,5% Tween 20

#### ECL1-Lösung

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5)  
0,1 ml 250 mM Luminol  
44 µl 90 mM p-Coumarsäure  
ad 10 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### ECL2-Lösung

6 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5)  
ad 10 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Sowohl das Luminol (250 mM) als auch die p-Coumarsäure (90 mM) wurden in DMSO gelöst und als 110 µl- bzw. 50 µl-Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.9.13 Zur Bestimmung der $\alpha$ -Amylase-Aktivität

#### **Substrat-Lösung**

54,5 mg      BPNPG7  
100 U         $\alpha$ -Glucosidase (bei pH 5,2)  
100 U        Glucoamylase (bei pH5,2)  
in 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Das Substrat wurde bereits in der angegebenen Menge geliefert und beinhaltet auch die beiden benötigten Enzyme.

## 3 METHODEN

### 3.1 Herstellung des Knoblauchsafte

Zur Herstellung des Knoblauchsafte wurde handelsüblicher Knoblauch geschält und mit Hilfe eines Entsafters gepresst. Der erhaltene Presssaft wurde in einem 50 ml konischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen und anschließend 10 min bei 2800 x g zentrifugiert (Megafuge 1.OR), wodurch feste und flüssige Bestandteile des Saftes grob voneinander getrennt werden konnten. Um auch die verbliebenen Feststoffe von der Flüssigkeit zu trennen, wurde der Saft anschließend noch einmal filtriert. Der so entstandene Knoblauchsaft konnte entweder direkt für Tests verwendet oder aber für maximal zwei Wochen bei 10°C gelagert werden. In einigen Versuchen verwendete Verdünnungen des Saftes wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit demineralisiertem Wasser ( $H_2O_{\text{bidest.}}$ ) hergestellt.

### 3.2 Analysemethoden

#### 3.2.1 Bioassay

Der zur anfänglichen Ermittlung der Wirksamkeit des frischen Knoblauchsafte und zur Abschätzung des Allicingehalte eingesetzte Bioassay wurde leicht modifiziert nach CURTIS *et al.* (2004) durchgeführt.

50 µl einer *E. coli*-Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,2 wurden in 10 ml handwarmem LB-Agar resuspendiert und in eine Petrischale (ø 9 cm) gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden mit einem abgeflämten Korkbohrer vier Löcher mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestochen. In diese Löcher wurden jeweils 25 µl Knoblauchsaft gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C konnte der Hemmhofdurchmesser bestimmt werden.

#### 3.2.2 HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wurde leicht modifiziert nach KREST (2000) zur Bestimmung des Allicingehalte des für Versuche verwendeten Knoblauchsafte eingesetzt.

Zunächst wurde der Knoblauchsaft 1:10 mit Wasser (HPLC grade) verdünnt und mit 1,5 ml internem Standard (4-Hydroxybenzoesäurebutylester; 0,05 mg ml<sup>-1</sup> in Methanol) gemischt. Um eine starke Verunreinigung der Chromatographiesäule zu verhindern, wurde das Gemisch durch

eine Polyethersulfon-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm (Steriflip; Millipore) filtriert, bevor 20 µl der Probe in die HPLC injiziert wurden. Mit Hilfe der Steuersoftware „Geminyx“ (Version 1.91) wurde der unten dargestellte Gradient gefahren (siehe Tab. 4), während dessen die Spektren (200 nm – 600 nm) der Inhaltsstoffe der Probe so wie einzelne Chromatogramme bei 254 nm aufgezeichnet wurden. Die verwendete HPLC-Anlage setzte sich aus den folgenden Modulen zusammen.

Injektor (Cheminert™)	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Degasser 3493	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Pumpe System 525	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Diodenarraydetektor DAD 540	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Vorsäule (MultoHigh 100, RP18 5µ, 10 x 4mm)	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Säule (MultoHigh 100, RP18 5µ, 125 x 4mm)	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe

#### Laufmittelzusammensetzung und Gradient (Flußrate: 1 ml min<sup>-1</sup>)

Laufmittel A:

70 VT Wasser (HPLC grade)

30 VT Methanol (HPLC grade)

*mit 85%iger Ortho-Phosphorsäure auf pH 2,0 eingestellt*

Laufmittel B:

100 VT Methanol (HPLC grade)

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	80	20
25	70	30
45	20	80
55	20	80
65	80	20
70	80	20

Tab. 4: Gradient der HPLC zur Quantifizierung des Allicingehalts des Knoblauchsafte

### 3.3 Pflanzenanzucht

#### 3.3.1 Tomaten für Versuche mit *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani*

Tomatensamen wurden auf angefeuchtete Erde (Vermehrungssubstrat A 200 der Firma Stender) ausgesät und mit feinem Sand bedeckt, der ebenfalls leicht angefeuchtet wurde. Nach dem Auskeimen und ersten Wachstum bei ca. 22°C und 16 / 8 h Licht / Dunkel-Rhythmus für eine Woche ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) wurden die Tomatenpflanzen in 7 x 7 cm Töpfe pikiert. Es folgte eine weitere Kultivierung für zwei Wochen, bevor die Pflanzen für Infektionsversuche verwendet wurden.

#### 3.3.2 *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) für die stabile Transformation

##### 3.3.2.1 Anzucht auf Erde

Sowohl Wildtyp-Pflanzen der Ökotypen „Landsberg erecta“ und „Columbia“, die zur Transformation genutzt werden sollten, als auch homozygote transgene Pflanzen wurden auf Erde (Vermehrungssubstrat A 200 der Firma Stender) angezogen. Nach der Aussaat erfolgte eine zweitägige Stratifikation bei 10°C. Anschließend wurden die Töpfe zur weiteren Kultivierung in eine Klimakammer bei 22°C und 8,5 / 15,5 h Licht / Dunkel-Rhythmus ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) gestellt. Kurz vor der Blüte wurde der Tag-Nacht-Rhythmus auf Langtagbedingungen (14-16 / 8 h Licht / Dunkel-Rhythmus ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )) umgestellt.

##### 3.3.2.2 Sterile Anzucht und Selektion transgener Pflanzen

Die Selektion transgener *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte durch die sterile Anzucht auf MS-Agar (2.8.4), dem entsprechend des Selektionsmarkers des zur Transformation verwendeten Vektors (pCHF1)  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Gentamycin hinzugefügt worden waren. Vor der Aussaat wurden die Samen durch eine viertelstündige Behandlung mit 70%igem Ethanol und anschließendem kurzen Waschen in 100% Ethanol oberflächensterilisiert. Nach der Aussaat wurden die Samen ebenfalls bei 10°C stratifiziert und anschließend unter Kurztagbedingungen (22°C, 8,5 h Licht ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )) angezogen. Im Vierblattstadium wurden die Keimlinge in Erde pikiert und bis kurz vor der Blüte unter denselben Bedingungen weiter kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Pflanzen bis zur Ernte der Samen unter Langtagbedingungen (14-16 / 8 h Licht / Dunkel-Rhythmus ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ )) gehalten.

### 3.3.3 Tabak für die Protoplastengewinnung

Für die Protoplastengewinnung wurden Tabakpflanzen der Sorte Petit Havana SR1 steril angezogen. Zur Oberflächensterilisation der Samen wusch man diese zunächst kurz in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und schwenkte sie anschließend 2 min in 70%igem Ethanol. Es folgte eine fünfminütige Inkubation in 3%iger Natriumhypochlorid-Lösung, bevor die Samen dreimal mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen wurden. Nach der Aussaat auf MS-Agar in sterilen Einmachgläsern (Firma Weck) erfolgte die Anzucht bei 22°C und einem 16 / 8 h Licht / Dunkel-Rhythmus ( $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ). Die weitere Vermehrung der steril angezogenen Pflanzen erfolgte mittels Sprosskultur.

## 3.4 Pathogenkultivierung / -erhaltung

### 3.4.1 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Die sterile Kultivierung von *Phytophthora infestans* erfolgte auf Tomatensaft-Agar (TSA; 2.8.3) bei 18°C im Dunkeln. Für Infektionsversuche wurden sechs bis acht Tage alte Kulturen verwendet. Um die Pathogenität des Erregers zu erhalten, wurde wöchentlich eine Passage über Kartoffelgewebe durchgeführt. Dazu wurden Pflanzkartoffeln, die nicht mit Keimhemmern behandelt worden waren, mit 70%igem Ethanol desinfiziert, halbiert und etwa einen halben Zentimeter unterhalb der Schnittfläche eingeschnitten. Nachdem eine Sporangiensuspension dorthinein pipettiert worden war, wurden die Kartoffeln vier Tage bei 18°C im Dunkeln in einer Feuchtekammer inkubiert. Sobald sie durchwachsen waren, wurden Myzelstücke auf frische TSA-Platten übertragen.

### 3.4.2 *Alternaria solani*

Der Erreger der Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel und Tomate, *Alternaria solani*, wurde ebenfalls auf Tomatensaft-Agar (2.8.3) kultiviert. Die Platten wurden durch Aufbringen einer Sporensuspension angeimpft und bei 22°C unter Weiß- und Schwarzlichtröhren inkubiert. Für Infektionstests wurden zwei Wochen alte Platten verwendet. Zur Langzeitlagerung wurden Sporen mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  abgespült und durch sterilen zweilagigen Verbandsmull filtriert. Anschließend wurde die Sporensuspension 1:1 mit 50%igem Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

## 3.5 Pathogen-Versuche

### 3.5.1 Klimakammer-Versuche

#### 3.5.1.1 *Phytophthora infestans* an Tomate

Zur Herstellung der Zoosporensuspension für die Inokulation von Tomatenpflanzen wurden *Phytophthora*-Platten mit sterilem, kaltem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  abgewaschen. Nach Filtration durch ein handelsübliches Plastikküchensieb wurde die Sporangienkonzentration mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und auf  $4\text{--}5 \times 10^4$  Sporangien  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt. Dann wurde die Suspension für mehrere Stunden bei  $10\text{--}12^\circ\text{C}$  inkubiert, um den Zoosporenschlupf anzuregen.

Für die Infektionsversuche wurden drei Wochen alte Tomatenpflanzen der Sorte „Hoffmanns Rentita“ verwendet. Pro Variante wurden fünf bis sieben Pflanzen behandelt ( $n = 5 / 7$ ). Vor der Inokulation wurden die Pflanzen mit verdünntem Knoblauchsaff bzw. Wasser besprüht. Sobald der Spritzbelag getrocknet war, wurden die Pflanzen mit Hilfe eines Druckluftsprayers mit der Sporensuspension tropfnass besprüht. Um die Infektion zu unterstützen, wurden die Pflanzen unter Hauben bei 100% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Versuche wurden in Klimakammern bei  $20^\circ\text{C}$  und einem Licht- / Dunkel-Rhythmus von 16 / 8 h ( $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) durchgeführt. Die Bonitur fand in der Regel vier Tage nach der Inokulation statt. Es wurde die befallene / nekrotisierte Blattfläche der drei unteren Blätter aller Pflanzen geschätzt. Dabei wurden Boniturstufen von 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% befallene Blattfläche verwendet.

#### 3.5.1.2 *Alternaria solani* an Tomate

Die Sporensuspension des Pilzes wurde durch Abwaschen der Sporen von Agar-Platten mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und Filtrieren durch sterilen, zweilagigen Verbandsmull hergestellt. Anschließend wurde die Anzahl der Sporen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und die Sporenkonzentration auf etwa  $6 \times 10^3$  Sporen  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt. Nachdem die Blattoberfläche drei Wochen alter Tomatenpflanzen mit verschiedenen Konzentrationen von frischem Knoblauchsaff bzw. Wasser besprüht worden und der Spritzbelag getrocknet war, wurde die *Alternaria*-Sporensuspension mit Hilfe eines Glas-Sprühfingers auf die Blattunterseite der Pflanzen aufgebracht. Die inokulierten Pflanzen wurden für vier Tage unter Hauben bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit,  $20^\circ\text{C}$  und 16h / 8h Licht- / Dunkel-Rhythmus ( $40 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) gehalten. Am vierten Tag nach Inokulation erfolgte die Bonitur, wie bereits unter 3.5.1.1 beschrieben.

### 3.5.2 Freilandversuch

Der Versuch wurde im Kreis Neuss auf einer Fläche mit sL / L-Boden (sandiger Lehm bis Lehm) durchgeführt, die von Herrn G. Wolfgarten (Dipl.-Ing. Agr.) bewirtschaftet wurde. Der durchschnittliche Jahresniederschlag liegt an diesem Standort bei 620 mm. Bei der angebauten Kartoffelsorte „Melody“ handelte es sich um eine gegenüber *P. infestans* mittelanfällige Sorte. Der Reihenabstand betrug 75 cm und der Pflanzabstand innerhalb der einzelnen Reihen wurde auf 25 cm festgelegt. Der Versuch wurde auf einer Fläche von 12 x 3 m so angelegt, dass er vier Reihen beinhaltete, wovon eine als Trennreihe zum Restbestand diente. Die Reihen wurden jeweils in vier 3 m lange Parzellen eingeteilt. Die einzelnen Wiederholungen wurden nach dem unten aufgezeigten Versuchsplan randomisiert angelegt (Abb. 10 A-C).

Die sechs Behandlungen wurden mit einer Rückenspritze mit Druckluft (siehe Abb. 10 C) zu den in der Praxis üblichen Terminen mit jeweils 0,5 l Spritzbrühe pro Konzentration durchgeführt (von Herrn A. Portz (Dipl.-Ing. Agr.) ). Um möglichst praxisnahe zu arbeiten, wurden die Verdünnungen mit Leitungswasser direkt vor Ort hergestellt. Bonitiert wurde acht Wochen nach der ersten und etwa eine Woche nach der letzten Behandlung. Hierbei wurde die nekrotisierte Blattfläche im Verhältnis zur gesamten Blattfläche eines Triebes in Prozent geschätzt. Soweit vorhanden wurden fünf Triebe pro Pflanze von vier Pflanzen in jeder Wiederholung bonitiert, wobei die oberen vier Triebe nicht berücksichtigt wurden, da es sich hierbei um Neuzuwachs handelte, der mit der letzten Behandlung nicht mehr erfasst worden war. Die Versuche wurden

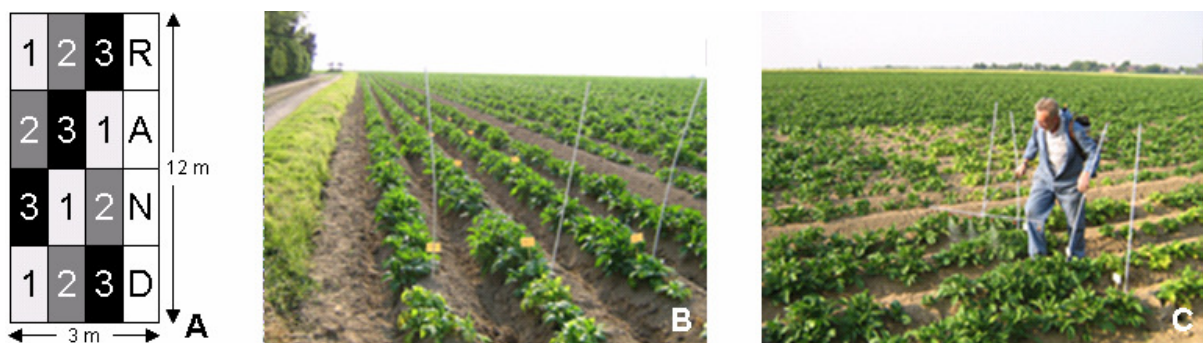


Abb. 10: **A:** Versuchsplan des Freilandversuchs; **B:** Versuchsfläche zu Beginn des Versuchs; **C:** Behandlung der Versuchspflanzen mit Hilfe einer Rückenspritze mit Druckluft

### 3.5.3 Versuche mit *Alternaria*-infizierten Karottensamen

Karottensamen einer natürlich mit *Alternaria* spp. infizierten Charge wurden freundlicherweise über Herrn Dr. E. Koch (BBA Darmstadt) von Frau S. Werner (Hild Samen GmbH, Marbach) zur Verfügung gestellt. Um zu überprüfen, ob eine Behandlung mit Knoblauch den Pilz

unterdrücken und somit die Keimrate der Samen erhöhen kann, wurde das Saatgut entweder in Knoblauchsafte gequollen oder lediglich der Gasphase des Saftes ausgesetzt. Beim Quellen der Samen wurden diese mit verschiedenen Verdünnungen frischen Knoblauchsafte oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  überschichtet und, wenn nicht anders vermerkt, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Begasung der Samen wurde unverdünnter Knoblauchsafte in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) pipettiert und über den dazugehörigen Deckel gestülpt, der zuvor mit trockenen oder in Wasser vorgequollenen Samen gefüllt worden war. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Als Positivkontrolle diente in allen Versuchen die Überschusstrockenbeize Aatiram® (Wirkstoff: Thiram;  $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen). Nach den Behandlungen wurden die Samen entweder sofort ausgesät oder zunächst im Luftstrom einer Sterilbank auf das Ausgangsgewicht zurückgetrocknet. Ausgesät wurden die Samen entweder auf Erde (Vermehrungssubstrat A 200, Fa. Stender) in Minigewächshäusern (36 x 22,5 cm), wobei sie anschließend mit Vermiculit bedeckt wurden oder auf 1%-igem  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar. Es folgte die Anzucht bei  $22^\circ\text{C}$  und 16 / 8 h Licht- / Dunkel-Rhythmus ( $105,5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ). Drei Wochen nach Aussaat auf Erde bzw. zwei Wochen nach Aussaat auf Agar wurde die Keimrate durch Auszählen der gesunden Keimlinge bestimmt.

### 3.5.3.1 Einbindung des Knoblauchs in ein „Seed-Priming“-Verfahren für Saatgut

Das „Seed-Priming“-Verfahren wurde leicht modifiziert nach JENSEN *et al.* (2004) durchgeführt. 350 *Alternaria* – infizierte Karottensamen wurden zunächst gewogen (Trockengewicht) und anschließend 16 h bei  $10^\circ\text{C}$  auf einer Wippe in verschiedenen Verdünnungen von frischem Knoblauchsafte bzw. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  inkubiert. Anschließend wurden die Samen im Luftstrom einer Sterilbank getrocknet. Während der Trocknungszeit wurde der Feuchtigkeitsgehalt der gequollenen Samen mehrfach durch Wiegen bestimmt. Sobald ein Feuchtigkeitsgehalt von etwa 40% erreicht war, wurde das Saatgut in Petrischalen gefüllt und in Plastikdosen mit belüfteten Deckeln 13 Tage bei  $18^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Samen auf  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar ausgesät und wie in 3.5.3 erläutert angezogen und ausgezählt.

### 3.5.3.2 Überprüfung der Lagerfähigkeit behandelter Karottensamen

Zur Überprüfung der Lagerfähigkeit mit Knoblauch behandelter Karottensamen wurde etwa die Hälfte der in den oben beschriebenen Versuchen verwendeten Samen für sechs Monate in verschlossenen Petrischalen bei  $10^\circ\text{C}$  gelagert und anschließend erneut auf  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar ausgelegt. Die Anzucht und Auswertung erfolgte wie bereits für die Ausgangsversuche beschrieben (3.5.3).

### 3.6 Phytotoxizität-Test

Um eine mögliche Phytotoxizität des Knoblauchsafte zu überprüfen, wurden drei Wochen alte Tomatenpflanzen mit verschiedenen Konzentrationen des Saftes, die teilweise deutlich über den in Klimakammer-Versuchen verwendeten lagen, tropfnass besprüht. Nachdem der Spritzbelag getrocknet war, wurden die Pflanzen vier Tage unter Hauben bei 22°C und 16 / 8 h Licht- / Dunkel-Rhythmus inkubiert ( $105,5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ), bevor die Hauben abgenommen wurden. Sechs Tage nach der Behandlung wurde die Phytotoxizität des Knoblauchs abgeschätzt, wobei der in Tabelle 5 wiedergegebene Schlüssel des EWRC (European Weed Research Council) zu Hilfe genommen wurde (GOROG NEE PRIVITZER *et al.*, 1988).

Phytotoxizität-Klasse	Eigenschaften (nekrotisierte Blattfläche im Verhältnis zur gesamten Blattfläche der Pflanze)
1	Keine Schäden (0 %)
2	Minimale Spuren (bis 2,5 %)
3	Sehr geringe Schäden (5 %)
4	Geringe Schäden (10 %)
5	Mittelstarke Schäden (15 %)
6	Deutliche Schädigung (25 %)
7	Starke Schädigung (35 %)
8	Sehr starke Schäden (67,5 %)
9	100 % Schädigung

Tab. 5: Klassifizierung der Phytotoxizität von Pflanzenschutzmitteln nach EWRC (siehe GOROG NEE PRIVITZER *et al.*, 1988)

Bis zu einer Einstufung in Klasse 2 kann ein Pflanzenschutzmittel eingesetzt bzw. weiterentwickelt werden (STIEGER (Syngenta Crop Protection), pers. Mitteilung)

### 3.7 Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Knoblauchs bzw. Allicins auf *Phytophthora infestans*

Die für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendeten Sporangien-Suspensionen wurden wie unter 3.5.1.1 erläutert hergestellt und auf eine Sporangien-dichte von  $4-5 \times 10^4$  Sporangien  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt.

### 3.7.1 Zoosporenschlupf

Um zu testen, ob der Schlupf der Zoosporen von *Phytophthora infestans* durch den Zusatz von Knoblauchsft zur Sporangien-Suspension beeinträchtigt wird, wurden der Suspension vor der Inkubation bei 10–12°C verschiedene Mengen Knoblauchsft hinzugegeben. Die Allicin-Konzentrationen lagen bei 0, 50, 100, 150, 250, 500  $\mu\text{g Allicin ml}^{-1}$  Suspension. Vor und nach der Inkubation wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Anzahl leerer Sporangien bestimmt. Die Differenz der beiden Werte stellt den Zoosporenschlupf dar.

### 3.7.2 Sporangien- und Zoosporenkeimung *in vitro*

Zur Untersuchung der Wirkung des Knoblauchs auf die Keimrate und das Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierter Zoosporen von *P. infestans*, wurden nach der Induktion des Zoosporenschlupfs je zehn 20  $\mu\text{l}$ -Tropfen der Suspension auf 3 Agar-Platten gegeben. Dem 1%-igen  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar war Knoblauchsft zugegeben worden, so dass eine Allicin-Konzentration von 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  erreicht wurde. Als Kontrolle dienten Platten ohne Knoblauchsft. Nach dem Auftropfen der Sporangien-Suspension wurden die Platten mit Micropore<sup>TM</sup>-Band verschlossen und in einer Feuchtebox bei 18°C im Dunkeln 4 h inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DM R) die Keimrate bei 50- bzw. 200-facher Vergrößerung bestimmt, wobei pro Platte 50 Sporangien bzw. encystierte Zoosporen ausgezählt wurden (n=150). Danach wurde unter Zuhilfenahme einer Digitalkamera (JVC Digital Camera KY-F75U) und der Software Discus (Version 32, Fa. Hilgers (Königswinter)) die Keimschlauchlänge von 15 Sporangien bzw. encystierte Zoosporen pro Platte gemessen (n=45).

### 3.7.3 Sporangien- und Zoosporenkeimung *in vivo*

#### 3.7.3.1 Inokulation

Nachdem drei Wochen alte Tomatenpflanzen mit verdünntem Knoblauchsft (50  $\mu\text{g Allicin ml}^{-1}$ ) bzw.  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  besprüht worden waren und der Spritzbelag getrocknet war, wurden mehrere Fiederblättchen pro Pflanze abgeschnitten und in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale (12 x 12 cm) platziert. Anschließend wurden pro Blatt fünf 20  $\mu\text{l}$ -Tropfen einer Sporensuspension von *Phytophthora infestans* auf die Blattoberseiten pipettiert. Die verschlossenen Platten wurden nun vier Stunden bei 20°C inkubiert, bevor 1  $\text{cm}^2$  große Blattstücke ausgeschnitten und der im Folgenden beschriebenen Färbung unterzogen wurden.

### 3.7.3.2 Säurefuchsin-Färbung (modifiziert nach CARMICHAEL (1955))

Bei Säurefuchsin handelt es sich um einen Farbstoff, der gut geeignet ist, um Pilze mit hyalinen Strukturen anzufärben, wobei vor allem die Zellwände gefärbt werden.

Nach der Inokulation wurden die Blattstücke durch eine 48-stündige Inkubation bei 60°C in Chloralhydrat (250g in 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) fixiert. Dies führte gleichzeitig zur vollständigen Entfärbung der Blattstücke. Dann wurden die Präparate für 1-2 h in einer 0,01%-igen Säurefuchsin-Lactophenol-Lösung gefärbt und im Anschluss daran in 50%-ige Glycerin-Lösung überführt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit Hilfe eines konvokalen Laser-Scan-Mikroskops (CLSM) der Firma Leica (TCS SP, Software: Leica TCS NT) bei 630- bzw. 1000-facher Vergrößerung (Anregungswellenlänge: 543nm, Emissionsbandpassfilter: 575-640 nm; 63x PL APO w, 100x PL FLUOTAR oil).

## 3.8 Untersuchungen zur Apoptose-Induktion durch Knoblauch am Beispiel von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Untersuchung der Induktion von Apoptose in eukaryotischen Zellen durch Knoblauch bzw. Allicin, wurden in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Hefe-Zellen der Stämme RS453 und SS330 (siehe 2.5.3) mit Knoblauchsaff behandelt, so dass 50 bzw. 200 µg Allicin ml<sup>-1</sup> Kultur vorhanden waren. Anschließend wurde das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion bestimmt (3.8.1) bzw. ein Caspase-Assay durchgeführt (siehe 3.8.2). Die Allicin-Konzentrationen wurden so gewählt, dass die Zellen beider Stämme ein deutlich vermindertes Wachstum zeigten, das Wachstum jedoch nicht vollständig unterdrückt wurde, um auszuschließen, dass durch die Allicin-Gabe eine Nekrose der Zellen ausgelöst und somit keine Apoptose induziert wurde. Nach der Behandlung wurden die Proben bei 28°C und 210 rpm bis zur Durchführung der im Folgenden beschriebenen Tests weiter inkubiert.

### 3.8.1 Glutathion-Messung

Der Glutathion-Gehalt der Hefe-Zellen wurde mit Hilfe eines leicht modifizierten Glutathion-Reduktase-Assays nach GRIFFITH (1980) bestimmt. Bei dieser Methode wird das Glutathiondisulfid (GSSG), also die oxidierte Form des Glutathions, durch die Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH reduziert, so dass das gesamte Glutathion einer Zelle im reduzierten Zustand (GSH) vorliegt. Dieses wird durch die Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu GSSG oxidiert und erneut von der Glutathion-

Reduktase zu GSH reduziert, wodurch der Kreislauf erneut beginnt. Aus der Reaktion von GSH und DTNB resultiert 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (NTB), ein farbiges Anion, dessen Bildung durch die Änderung der Absorption bei 412 nm detektiert werden kann (Abb. 11 A). Auf diese Weise kann jedoch lediglich der Gesamt-Glutathiongehalt einer Kultur, durch den Vergleich mit einer Eichgeraden, die zuvor aufgenommen werden muss, bestimmt werden. Um eine Aussage über das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH / GSSG) machen zu können, muss dem Reaktionsgemisch zunächst das reduzierte Glutathion durch eine Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin entzogen werden. Dann kann der Anteil an oxidiertem Glutathion ermittelt werden (Abb. 11 B). Zieht man nun den GSSG-Gehalt vom gemessenen Gesamt-Glutathiongehalt ab, so kann man den Anteil des reduzierten Glutathions errechnen und eine Aussage über das Verhältnis von GSH / GSSG machen. Dies wiederum gibt einen Hinweis auf den Oxidationsstatus der Hefe-Zellen.

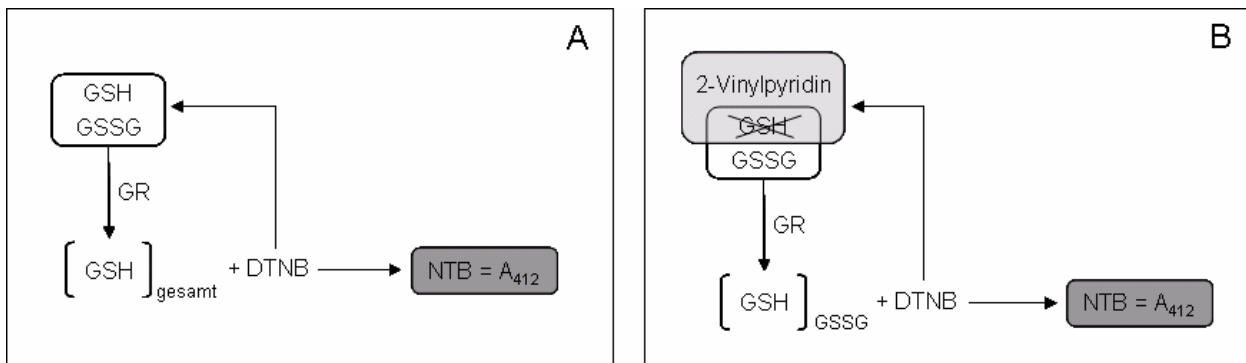


Abb. 11: Schematische Darstellung der Reaktionen im Verlauf des Glutathion-Reduktase-Assays zur Ermittlung des Glutathion-Gehalts in Hefe-Zellen

A: Reaktion zur Bestimmung der Gesamt-Glutathionkonzentration, B: Reaktion zur Messung des Anteils von oxidiertem Glutathion (GSSG), der reduzierte Teil wird durch 2-Vinylpyridin derivatisiert und somit dem Reaktionsgemisch entzogen; GR = Glutathion-Reduktase

### Zellernte und -aufschluss

Direkt nach der Behandlung (3.8) wurden je 50 ml Kultur (behandelt und unbehandelt) bei 4 332 x g zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Die gewonnenen Pellets wurden zweimal in Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) (2.9.1) gewaschen, bevor sie in 1 ml des Puffers aufgenommen wurden. Anschließend wurde die Suspension in ein mit etwa 200 µl Glaskugeln (ø ca. 0,5 mm) gefülltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde dreimal für jeweils 1 min gevortext und 1 min auf Eis inkubiert. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 15 800 rpm und Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge 5415C), wurde der Überstand abgenommen und bis zur Messung des Glutathion-Gehaltes auf Eis gehalten. Für die Messung wurden 12,5 µl-Aliquots verwendet.

### *Erstellung der Eichgeraden*

Zur Kalibration des Assays wurden Verdünnungsreihen der beiden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gelösten Glutathion-Standards gemessen. Für das reduzierte Glutathion (GSH) wurden Konzentrationen von 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 und  $6,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  eingesetzt. Um auch den niedrigeren Konzentrationsbereich abzudecken und die Kurve bei den Gemischen der beiden Standards nicht in einen zu hohen Messbereich zu verlagern, wurden vom Glutathiondisulfid (GSSG) nur halb so hohe Konzentrationen verwendet. Für diese Substanz wurden Lösungen mit 0,63, 1,25, 1,88, 2,5 und  $3,13 \mu\text{g ml}^{-1}$  hergestellt. Umgerechnet in Molarität, handelte es sich beim GSSG sogar nur um  $\frac{1}{4}$  dessen, was vom GSH verwendet wurde. Aufgrund der Spaltung des Disulfids in zwei Moleküle reduziertes Glutathion durch die Glutathion-Reduktase im Verlauf des Nachweises kann man auf Molekülebene jedoch von einer halbierten Menge sprechen. Darüber hinaus wurden auch Gemische der beiden Standards gemessen, bei denen der Gesamt-Gehalt bestimmt wurde oder der Gehalt an oxidiertem Glutathion, nachdem das GSH derivatisiert worden war.

### *Derivatisierung des reduzierten Glutathions (GSH)*

Zur Messung der GSSG-Konzentration wurde das vorhandene reduzierte Glutathion durch Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin entfernt. Dabei sollte der pH-Wert nicht unter 5,5 liegen, da die Derivatisierungsreaktion dann nicht mehr zuverlässig ablaufen würde. Zu  $100 \mu\text{l}$  des Zellaufschlusses bzw. des Standard-Gemischs wurden  $2 \mu\text{l}$  2-Vinylpyridin gegeben und bei  $22^\circ\text{C}$  und 1500 rpm für 1 h inkubiert (Eppendorf Thermomixer Comfort). Nach einer Zentrifugation bei  $15\,800 \times g$  und Raumtemperatur für 2 min (Eppendorf Centrifuge 5415C), konnte der Überstand abgenommen und zur Messung des oxidierten Glutathions verwendet werden.

### *Messung des Glutathion-Gehaltes*

Zur Bestimmung des Glutathion-Gehaltes wurde ein Reaktionsgemisch aus den im Folgenden angegebenen Komponenten angesetzt.

12,5  $\mu\text{l}$  Standard-Lösung bzw. Zellaufschluss  
5  $\mu\text{l}$  Glutathion-Reduktase ( $20 \text{ u ml}^{-1}$ , in Na-P-Puffer, pH 7,5)  
50  $\mu\text{l}$  6 mM DTNB (in Na-P-Puffer, pH 7,5)  
350  $\mu\text{l}$  0,3 mM NADPH (in Na-P-Puffer, pH 7,5)  
332,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Sobald die Reaktion durch die Zugabe der Probe gestartet war, wurde für 20 min die Absorption bei 412 nm mit einem Messintervall von 30 sec gemessen.

### 3.8.2 Caspase-Assay

Mit Hilfe des SR-FLICA™ Poly Caspase Apoptosis Detection Kits ist es möglich Caspasen, die bei der Induktion von Apoptose in eukaryotischen Zellen aktiviert werden, zu visualisieren. Das Reagenz SR-FLICA™ (Fluorescent Labeled Inhibitors of Caspases) besteht aus Sulforhodamin, einem rot fluoreszierenden Farbstoff, der an einen Caspase-Inhibitor gekoppelt ist, welcher an alle aktiven Caspasen bindet. Eine Fluoromethylketon-Gruppe unterstützt die kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Caspase. Nach Zugabe des Reagenz wird dieses sofort von den Zellen aufgenommen und kann dort an die aktiven Caspasen binden.

Etwa 24 h nach der Behandlung (3.8) wurde die OD<sub>600</sub> der verschiedenen Proben ermittelt und die Kulturen mit YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 verdünnt. Nachdem jeweils 300 µl Zellsuspension bei 11 600 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert worden waren (Eppendorf Centrifuge 5415C), wurden die Pellets zweimal mit YPD-Medium gewaschen und anschließend in 300 µl Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit 10 µl SR-FLICA™-Arbeitslösung gemischt und für 1,5 h bei 28°C inkubiert. Während dieser Zeit konnte der Caspase-Inhibitor an aktive Caspasen in den Hefe-Zellen binden. Im Anschluss wurde der nicht-gebundene Inhibitor durch zweimaliges Waschen mit 1x Assay-Puffer (Zentrifugation bei 11 600 x g für 5 min) entfernt und die Zellen in 200 µl 1x Assay-Puffer aufgenommen. Die Betrachtung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops bei 630-facher Vergrößerung (Objektiv: 63x PL APO w), wobei die Fluoreszenz apoptotischer Zellen durch die Bestrahlung mit 488 nm und 568 nm angeregt und mit einem Emissionsfilter in einem Bereich von 590 nm bis 610 nm detektiert wurde.

## 3.9 Molekularbiologische Arbeiten

### 3.9.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 3.9.1.1 Isolation von Plasmid-DNA

##### **Zur Analyse** (Mini-Präparation)

Die Plasmid-Isolation aus Bakterien im analytischen Maßstab erfolgte mit Hilfe von Aufreinigungskits verschiedener Anbieter, wie Eppendorf, Promega und Invitrogen (FastPlasmid™ Mini, Wizard® Plus SV Minipreps, Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit). Alle drei Systeme setzen sich aus mehreren Schritten zusammen. Dabei werden die Bakterien im ersten Schritt der Kits von Promega und Invitrogen zunächst einer alkalischen Lyse unterzogen, an die sich die Bindung der DNA an eine Silicagel-Membran anschließt. Im letzten Schritt wird die gebundene DNA gereinigt und eluiert. Im Gegensatz dazu besteht der erste Schritt des Eppendorf Kits aus einer enzymatischen Lyse der Zellen, bei der gleichzeitig Zellinhalte denaturiert und gelöst werden, RNA abgebaut und die DNA an eine Matrix gebunden wird.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

##### **Zur Transformation von Tabakprotoplasten** (Maxi-Präparation)

Im präparativen Maßstab wurde Plasmid-DNA mit dem JetStar 2.0 Maxiprep-Kit der Firma Genomed aus Bakterienkulturen aufgereinigt. Die Isolation beruht auf den für die Miniprep-Kits von Promega und Invitrogen angegebenen Methoden, wobei sich in diesem Fall noch eine Isopropanol-Fällung zur Aufkonzentrierung der DNA anschließt.

Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 3.9.1.2 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen

Ein bis zwei Blätter einer *Arabidopsis*-Pflanze wurden zunächst unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben und anschließend in 350 µl Lyse-Puffer homogenisiert. Durch die Zugabe von 150 µl Chloroform und eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 15 800 x g und Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge 5415C) erfolgte die Trennung von zwei Phasen, wobei sich die DNA in der wässrigen Phase befand. Von dieser wurden 350 µl zu demselben Volumen Isopropanol gegeben und gut vermischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation zur Präzipitation der DNA schloss sich eine Zentrifugation für 5 min bei 15 800 x g und Raumtemperatur an. Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und

im Luftstrom einer Sterilbank getrocknet, bevor die DNA durch Zugabe von 150 µl TE-Puffer und mehrfaches Ansnipsen des Reaktionsgefäßes gelöst wurde. Die in TE-Puffer resuspendierte DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### 3.9.1.3 RNA-Isolation aus Knoblauch (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Geschälte Knoblauchzehen wurden in kleine Stücke geschnitten und unter flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen. Dieses wurde anschließend mit 400 µl RNA-Extraktionspuffer (2.9.2) gemischt, bevor 400 µl Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0) hinzugefügt und ebenfalls gut gemischt wurden. Nach der Zugabe eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemischs (24:1) wurde die Probe 5 min bei 15 800 x g und Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 400 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch gefülltes Reaktionsgefäß überführt, gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Es folgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von ¼ Volumen 10 M LiCl und Inkubation über Nacht bei 4°C. Im Anschluss daran wurde 15 min bei 20 817 x g und 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417R) zentrifugiert. Die folgenden Schritte der RNA-Aufreinigung wurden im Kühlraum (4°C) durchgeführt, um ein Degradieren der RNA zu verhindern. Das Pellet wurde in 250 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-behandelt) resuspendiert und die enthaltene RNA durch Zugabe von 25 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 750 µl Ethanol (95%) und eine 30-minütige Inkubation auf Eis erneut gefällt. Die anschließende Zentrifugation für 15 min bei 20 817 x g und 4°C führte zur Bildung eines RNA-Pellets, welches in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert wurde. Die Lagerung der so gewonnenen RNA erfolgte bei -80°C.

### 3.9.1.4 RNA-Isolation aus transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (nach CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987; CHOMCZYNSKI & MACKEY, 1995)

100 mg fein gemörsertes Blattmaterial von 6 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurde in 1 ml TRI-Reagenz (2.9.2) gegeben. Das Gemisch wurde durch Vortexen (10 sec) homogenisiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur gab man 100 µl 1-Brom-3-Chlorpropan hinzu und vortexte erneut für 10 sec, um die Proben anschließend 10 min bei Raumtemperatur stehen zu lassen und dann 10 min bei 4°C und 20 817 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R) zu zentrifugieren. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit 1-Brom-3-Chlorpropan gemischt, inkubiert und zentrifugiert, bevor 450 µl der wässrigen Phase mit demselben Volumen Isopropanol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um die RNA zu präzipitieren. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 20 817 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R) wurde die RNA pelletiert. Nachdem das Pellet mit 70%-igem

Ethanol (DEPC-behandelt) gewaschen worden war (Zentrifugation: 5 min 20 817 x g 4°C), wurde es in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Probe mit 60 µl Ethanol (100%) und 3 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert, um die RNA erneut zu fällen und ihre Reinheit zu erhöhen. Am nächsten Tag wurde die RNA durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 20 817 x g (Eppendorf Centrifuge 5417R) pelletiert und noch einmal mit 70%-igem Ethanol (DEPC) gewaschen. Die aufgereinigte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### 3.9.1.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR oder Restriktion wurden diese zunächst in einem Agarosegel elektrophoretisch von eventuellen unerwünschten Fragmenten getrennt. Die Banden, die der Größe des gewünschten DNA-Stückes entsprachen, wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Perfectprep® Gel Cleanup oder des peqGold Gel Pure Kits nach den Anweisungen der Hersteller aufgereinigt.

### 3.9.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die in Wasser oder Puffer gelöste RNA bzw. DNA 1:100 mit Wasser verdünnt und die optische Dichte dieser Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen (Beckmann DU 7500 Spectrophotometer). Die Nukleinsäurekonzentration in der unverdünnten Probe wurde nach der folgenden Formel berechnet, wobei „V“ für den Verdünnungsfaktor steht. Der Multiplikationsfaktor „F“ beträgt bei RNA 40 und bei dsDNA 50 (nach MÜLHARDT, 2002).

$$c [\mu\text{g ml}^{-1}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm gibt dabei Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäure. Allerdings kann dieser Quotient auch durch den pH-Wert und Salzgehalt der Lösung beeinflusst werden (WILFINGER *et al.*, 1997). Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte demnach einen Quotienten der optischen Dichten zwischen 1,5 und 2,2 aufweisen.

### 3.9.2 Herstellung kompetenter Zellen

#### 3.9.2.1 *Escherichia coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die OD<sub>600</sub> der *E. coli* -Kultur sollte bei ca. 0,5 liegen, so dass sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Die Zellsuspension wurde auf vier gekühlte sterile 50 ml-Falcon®-Gefäße verteilt und 10 min auf Eis stehen gelassen, bevor sie 10 min bei 1 559 x g und 4°C zentrifugiert wurde (Megafuge 1.OR). Das Zellpellet wurde in 7,5 ml eiskalte TFBII-Lösung (2.9.4) resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurden die Zellen erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml eiskalter TFBII-Lösung aufgenommen. Je 200  $\mu$ l der nun für die Transformation mittels Hitzeschock vorbereiteten Zellen wurden in sterile vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

#### 3.9.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Sobald die Kultur des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes GV3101 eine OD<sub>600</sub> von 1 bis 1,5 erreicht hatte, wurde sie auf sterile vorgekühlte 50 ml-Falcon®-Gefäße verteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 2 122 x g und 4°C (Megafuge 1.OR). Das erhaltene Zellpellet wurde in eiskaltem sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert und die letzten beiden Schritte zum Waschen der Zellen wiederholt. Zum Schluss wurden die Zellen in 500  $\mu$ l sterilem 10%-igem Glycerin aufgenommen, in 50  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

### 3.9.3 Allgemeine Klonierungsmethoden

#### 3.9.3.1 DNase-Behandlung von RNA

Durch die Behandlung mit DNasen können etwaige DNA-Verunreinigungen isolierter RNA entfernt werden. Hierzu wird die RNA mit DNase-Puffer, RNase-freiem Wasser und RNase-freier DNase in einem Endvolumen von 10  $\mu$ l gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNase durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C inaktiviert und die RNA bis zur weiteren Nutzung (z.B. zur cDNA-Synthese) auf Eis gehalten.

#### 3.9.3.2 cDNA-Synthese

Die isolierte und DNase-behandelte RNA sollte zunächst in cDNA umgeschrieben werden, um sie anschließend als Matrize für die PCR verwenden zu können. Hierzu wurden 10  $\mu$ l der DNase-Behandlung mit 1  $\mu$ l Random-Hexamer-Primer oder oligo(dT)18-Primer (beide von

Fermentas GmbH) und 1 µl RNase-freiem Wasser versetzt und 5 min bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 4 µl Puffer (5x; Fermentas GmbH), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase und 1 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die erhaltene cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.9.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (SAIKI *et al.*, 1988) ist es möglich ein bestimmtes DNA-Fragment zu amplifizieren, wobei spezifische Oligonukleotide (Primer) als Startpunkte der Synthese dienen. Die Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert. Darüber hinaus können durch die Oligonukleotide gezielt Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt werden, die die Ligation des Amplifikats in ein Plasmid ermöglichen. Dieses Plasmid wiederum kann als Vektor für die Transformation von Bakterien oder Pflanzen dienen. Die PCR kann zusätzlich zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation genutzt werden. Die Polymerase-Ketten-Reaktion setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Phasen zusammen, welche sich durch ihre spezifischen Temperaturen unterscheiden (Abb. 12). Die erste Phase bei 94-98°C dient der Denaturierung der Matrizen-DNA, d.h. der Trennung der beiden DNA-Stränge. Im Anschluss daran erfolgt die Anlagerung der Primer, auch Annealing genannt, bei der die verwendete Temperatur von der Primer-Beschaffenheit, z.B. dem GC-Gehalt, abhängig ist. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Primer und die eingesetzten Temperaturen sind Tabelle 3 (Kapitel 2.7.2) zu entnehmen. Die dritte und letzte Phase findet in der Regel bei 72°C statt, kann aber bei Verwendungen besonderer DNA-Polymerasen auch bei 68°C durchgeführt werden. Bei dieser Phase spricht man von der Elongationsphase, im Verlauf derer der fehlende DNA-Strang, beginnend mit dem Vorwärts-Primer und endend mit dem Rückwärts-Primer, synthetisiert wird.

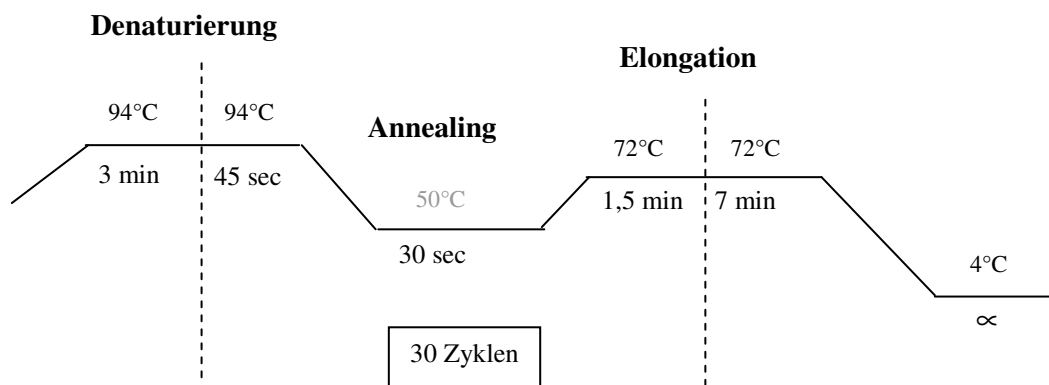


Abb. 12: Schematische Darstellung einer typischen Polymerase-Ketten-Reaktion

### Zur Klonierung einer einzelnen DNA-Sequenz

Um eine bestimmte Sequenz für die Klonierung in einen Vektor zu amplifizieren, wurde das folgende Reaktionsgemisch zusammen pipettiert.

2 µl Polymerase-Puffer (10x) (bzw. 4 µl bei 5x konzentriertem Puffer)  
1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (bzw. 0,4 µl bei Verwendung der *Phusion*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase)  
1 µl Primer A (10 µM; forward)  
1 µl Primer B (10 µM; reverse)  
1 µl cDNA  
0,4 µl DMSO (nur bei Verwendung der *Accu Taq*<sup>TM</sup> LA DNA Polymerase)  
0,2 µl DNA-Polymerase  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st. (steril) auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt

Die Polymerase-Ketten-Reaktion fand in einem Thermocycler der Firma MJ Research statt, wobei die Elongation bei Verwendung der *Accu Taq*<sup>TM</sup> LA DNA Polymerase bei 68°C durchgeführt wurde.

### Zur Klonierung zweier fusionierter DNA-Sequenzen (assembly PCR)

Unter „assembly PCR“ versteht man das Verschmelzen zweier DNA-Fragmente mit Hilfe von Polymerase-Ketten-Reaktionen, bei denen Oligonukleotide eingesetzt werden, die eine überlappende Sequenz der beiden zu vereinigenden Fragmente beinhalten. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine einzige PCR, sondern um mehrere aneinander anschließende Reaktionen.

Im *ersten Schritt* werden die beiden zu vereinigenden DNA-Fragmente in zwei getrennten PCR-Ansätzen amplifiziert. Dabei wird an die spätere vordere Sequenz am 3'-Ende ein Stück der Sequenz des zweiten Fragments angehängt und am 5'-Ende der zweiten Sequenz ein Stück der ersten. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen, wobei die Polymerase erst hinzugefügt wurde, wenn die 94°C der ersten Denaturierungsphase erreicht worden waren.

5 µl Polymerase-Puffer (10x)  
0,4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)  
1 µl Primer A oder B (10 µM; forward)  
1 µl Primer C oder D (10 µM; reverse)  
1 µl DNA  
5 µl 1:10-verdünnte *PfuTurbo*® DNA Polymerase  
36,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Es wurden mehrere Ansätze für jedes DNA-Fragment pipettiert, bei denen die Matrizen-DNA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurde. Für die Amplifikation wurde ein PCR-Programm mit 20 Zyklen gewählt.

Der *zweite Schritt* besteht aus der eigentlichen „assembly PCR“, bei der die beiden Fragmente durch die überlappenden Sequenzteile aneinander gelagert werden sollen. Hierzu wurden die PCR-Produkte der ersten PCR verwendet, bei denen eine deutliche, aber nicht überstrahlende, Bande in der erwarteten Größe auf dem Kontrollgel zu sehen war. Zunächst wurden die entsprechenden Amplifikate mit Hilfe eines präparativen Agarosegels aufgereinigt und anschließend die zu fusionierenden DNA-Fragmente so miteinander gemischt, dass sie etwa zu gleichen Teilen in der Lösung vorlagen. Mit dieser DNA-Lösung wurde das im Folgenden beschriebene Reaktionsgemisch angesetzt.

5 µl Polymerase-Puffer (10x)  
0,4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)  
2 µl DNA-Gemisch  
5 µl 1:10-verdünnte *PfuTurbo*® DNA Polymerase  
37,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Zur Aneinanderlagerung der beiden Fragmente wurde ein Programm mit nur 10 Zyklen verwendet.

Im *dritten Schritt* wurden die aneinander gelagerten Fragmente als Matrize genutzt, um so die fusionierten Sequenzen zu amplifizieren. Für die Reaktion wurden folgende Komponenten zusammen gegeben.

5 µl Polymerase-Puffer (10x)  
0,4 µl dNTP-Mix (je 10 mM)  
1 µl Primer A (10 µM; forward)  
1 µl Primer D (10 µM; reverse)  
1 µl DNA (unverdünnt, 1:10- oder 1:100-verdünnt)  
5 µl 1:10-verdünnte *PfuTurbo*® DNA Polymerase  
36,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Das PCR-Programm sah 35 Zyklen für die Amplifikation vor.

### **Zum Transformationsnachweis**

Auch zum Nachweis, dass ein bestimmtes DNA-Fragment erfolgreich in einen fremden Organismus eingebracht wurde, wurde die PCR genutzt. In diesem Fall setzte sich das Reaktionsgemisch wie folgt zusammen.

10 µl Red Taq<sup>TM</sup> Ready Mix<sup>TM</sup>  
1 µl Primer A (10 µM; forward)  
1 µl Primer B (10 µM; reverse)  
8 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Zur Überprüfung von Bakterien-Transformationen wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers einige Zellen einer auf Selektionsmedium gewachsenen Kolonie in diesen Ansatz gegeben. Mit den am Zahnstocher verbleibenden Zellen wurde gleichzeitig eine Über-Nacht-Kultur des Klons angeimpft. Sollte die Transformation von Pflanzen getestet werden, so wurden 2 bzw. 5 µl des Wassers durch cDNA bzw. genomische DNA der selektierten Pflanzen (vgl. 3.3.2.2) ersetzt.

### **3.9.3.4 Anhängen von A-Überhängen an PCR-Fragmente**

DNA-Polymerasen mit einer „Proofreading“-Funktion werden, aufgrund ihrer geringeren Fehlerhäufigkeit bei der Sequenz-Amplifikation, für die Synthese von DNA-Sequenzen eingesetzt, welche zur Klonierung verwendet werden sollen. Diese Enzyme synthetisieren DNA-Stränge jedoch lediglich mit glatten Enden, d.h. die bei einer Synthese mit anderen Polymerasen vorhandenen A-Überhänge fehlen. Da diese aber für die Ligation in einen Klonierungsvektor, wie z.B. den in dieser Arbeit verwendeten pGEM-TEasy, zwingend erforderlich sind, ist es

notwendig nach der Amplifikation mittels PCR die A-Überhänge mit Hilfe einer Taq-Polymerase nachträglich anzuhängen. Hierzu wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Taq-Polymerase-Puffer (10x; Fermentas GmbH), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl dATP (5 mM), 3,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril) und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase GmbH) zusammengegeben und 15 min bei 72°C inkubiert. Danach wurden die Fragmente entweder direkt in den Vektor ligiert oder zunächst mittels einer präparativen Gelelektrophorese aufgereinigt.

### 3.9.3.5 Restriktion

#### **Zur Klonierung**

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor zu ligieren, müssen beide mit denselben Restriktionsendonukleasen geschnitten werden, um kompatible Enden zu produzieren. Diese können dann mit Hilfe einer DNA-Ligase verknüpft werden. Die zu klonierenden PCR-Produkte wurden zunächst in einen Klonierungsvektor (pGEM-TEasy) eingefügt. Nach der Transformation und Vermehrung in *E. coli* wurden sie mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wieder herausgeschnitten und konnten anschließend in einen Expressionsvektor ligiert werden. Für die Restriktion wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert.

15 µl Plasmid

2 µl Puffer (10x)

1 µl je Restriktionsendonuklease

1-2 µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (abhängig ob 1 oder 2 Enzyme verwendet wurden)

Nach einer einstündigen Inkubation bei der für das jeweilige Restriktionsenzym spezifischen Temperatur (siehe Tab. 1; Kapitel 2.3), konnten die Fragmente mittels präparativer Gelelektrophorese getrennt und aufgereinigt werden.

Sollte ein Vektor für die Klonierung vorbereitet werden, wurde nach demselben Protokoll vorgegangen. Wurde das Plasmid jedoch lediglich mit einem Enzym geschnitten, mußte vor der Aufreinigung noch eine Phosphatase-Behandlung durchgeführt werden (3.9.3.6), um eine Religation zu verhindern.

#### **Zur Analyse**

Der Erfolg einer Ligation kann ebenfalls mit Hilfe einer Restriktion überprüft werden. Hierbei werden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass je nachdem, ob das Fragment eingebaut wurde oder nicht, unterschiedlich große Fragmente entstehen. Diese können dann im Agarosegel getrennt und auf diese Weise ihre Größe bestimmt werden (3.9.3.8). Im Unterschied zur

Restriktion für eine Klonierung wurden nur 5 µl einer Minipräparation des Plasmids eingesetzt und entsprechend auch nur 0,5 µl des Enzyms (bzw. der Enzyme) zugeben. Das fehlende Volumen wurde mit sterilem Wasser ( $H_2O_{\text{bidest.}}$ ) aufgefüllt.

### 3.9.3.6 Dephosphorylierung

Um zu verhindern, dass ein mit nur einem Restriktionsenzym geschnittener Vektor religiert, können die Enden nach dem im Folgenden beschriebenen Protokoll dephosphoryliert werden. Dazu wurden 30 µl des linearisierten Plasmids mit 4 µl Phosphatase-Puffer (10 x), 1 µl alkalische Phosphatase (Fermentas GmbH) und 5 µl  $H_2O_{\text{bidest.}}$  gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 85°C gestoppt. Der so für die Integration von DNA-Fragmenten vorbereitete Vektor wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.9.3.7 Ligation

#### **Direkte Klonierung von PCR-Produkten (pGEM-TEasy)**

Die direkte Klonierung von PCR-Produkten ohne vorherige Restriktion und / oder Aufreinigung wurde unter Zuhilfenahme des pGEM-TEasy System von Promega durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen bereits durch die Restriktionsendonuklease *EcoR* V linearisierten Vektor, an dessen 3'-Enden Thymidine angehängt worden sind. Durch diese T-Überhänge wird ein Religieren des Vektors verhindert und gleichzeitig kompatible Enden für PCR-Produkte, die durch die Aktivität thermostabiler Polymerasen A-Überhänge besitzen, bereitgestellt.

Für die Ligation wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

1 µl Ligase-Puffer (10x; Promega)  
1 µl Vektor-Mix  
7 µl PCR-Produkt  
1 µl T4-DNA-Ligase (Promega)

Anschließend konnte der Vektor samt PCR-Produkt in chemisch kompetente DH5α-Zellen transformiert und auf diese Weise vermehrt werden.

#### **Klonierung in Expressionsvektoren**

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas GmbH. Dabei sollte das Verhältnis von Vektor zum

einzubringenden DNA-Fragment etwa 1:3 sein. Da die DNA-Fragmente deutlich kleiner waren als die Vektoren, wurden in den meisten Fällen 1-2 µl des Vektors, 1 µl Ligase-Puffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase eingesetzt und mit dem DNA-Fragment auf ein Endvolumen von 10 µl pro Ligationsansatz aufgefüllt. Die Reaktionsgemische wurden entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert, bevor sie in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert wurden (3.9.3.9).

### 3.9.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

#### **Analytische Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe voneinander zu trennen. Durch den Vergleich mit Größenmarkern (2.4) kann die Größe der DNA-Stücke bestimmt werden. Dies ermöglicht z.B. die Überprüfung des Ergebnisses einer PCR oder der Integration eines DNA-Fragments in einen Vektor. Je kleiner die zu analysierenden Fragmente sind, desto höher prozentig sollte das Agarose-Gel sein.

In den meisten Fällen kam ein 1%-iges Agarosegel (in 1x TAE-Puffer (2.9.4)) zum Einsatz. Dem Gel wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben, welches der Anfärbung der DNA diente, um diese später unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Die Proben wurden 1:10 mit Ladepuffer (2.9.4) versetzt. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit einer Spannung von 80-100 V durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Lichtbestrahlung (302 nm) fotografiert und die Fragmentgrößen anhand des Größenmarkers abgeschätzt.

#### **Präparative Gelelektrophorese**

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese diente der Aufreinigung von DNA-Fragmenten. Bei der Herstellung der Gele wurden lediglich Gelkämme mit breiteren Stegen verwendet, so dass größere Geltaschen entstanden, die das Auftragen des gesamten Probenvolumens erlaubten. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Banden mit Hilfe eines Skalpell ausgetrennt und wie unter 3.9.1.5 beschrieben aufgereinigt.

### 3.9.3.9 Transformationen

#### **Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli* DH5α**

Chemisch kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes DH5α wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Dann gab man 1 µl eines aufgereinigten Plasmids oder 10 µl eines Ligationsansatzes (3.9.3.7) zu 200 µl der Zellen und inkubierte das Gemisch für 15 min auf Eis, um ein Anlagern der DNA an die Zellen zu ermöglichen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min, bei dem die DNA von

den Zellen aufgenommen werden sollte. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden den Zellen 250 µl LB-Medium zugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen etwa 45 min bei 37°C und 600 rpm geschüttelt (Eppendorf Thermomixer Comfort), bevor sie auf LB-Agar ausplattiert wurden. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Agar das Antibiotikum zugegeben, für welches das eingebrachte Plasmid eine Resistenz trug. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag konnten Einzelkolonien gepickt und analysiert werden.

### **Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens***

50 µl-Aliquots kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen des Stammes GV3101 wurden auf Eis aufgetaut. Gleichzeitig gab man 2-3 µl der zu transformierenden DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und stellte sie ebenfalls auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien zur DNA pipettiert, durch leichtes Anschnipsen des Reaktionsgefäßes gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Kurz vor der Transformation gab man die Zellsuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten. Die Elektroporation wurde mit dem „Agr“-Programm des Elektroporators (MicroPulser; BioRad) durchgeführt, bei dem ein einmaliger Stromstoß von  $22 \text{ kV cm}^{-1}$  ausgelöst wird. Sofort im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration für etwa 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf Selektionsmedium (YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen (2.8.1)) ausplattiert und für 48 h bei 28°C inkubiert.

### **Co-Transformation von *Saccharomyces cerevisiae***

Zunächst wurde eine Über-Nacht-Kultur mit Zellen des Hefe-Stammes RS453 in YPD-Medium (2.8.2) angesetzt. Diese Vorkultur diente am folgenden Tag dazu 50 ml YPD-Medium auf eine  $OD_{600}$  von 0,2-0,3 einzustellen. Diese Kultur wurde solange bei 28°C und 210 rpm inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht hatte. Dann wurden die Zellen in ein steriles 50 ml-Falcon®-Gefäß überführt und 5 min bei 695 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Zum Waschen der Zellen wurden diese in sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Lithiumacetat aufgenommen und 15 sec bei 15 700 x g und Raumtemperatur (Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl 0,1 M Lithiumacetat resuspendiert und in 50 µl-Aliquots auf sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach dem erneuten kurzen Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurden die folgenden Komponenten pro Transformationsansatz zu den Zellen gegeben.

240 µl 50%-iges Polyethylenglycol (PEG)  
36 µl 1 M Lithiumacetat  
10 µl Heringssperm-DNA (10 mg/ml) (gekocht und abgekühlt)  
ca. 1 µg DNA  
ad 360 µl mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Das Gemisch wurde 1 min gevortext und anschließend 30 min bei 28°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 36 µl DMSO und Inkubation für 15 min bei 42°C, bevor die Zellen 15 sec bei 3 300 x g zentrifugiert wurden (Eppendorf Centrifuge 5415C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und zur Selektion transformierter Zellen auf YNBD-Medium ohne Uracil ausplattiert. Die Inkubation auf dem genannten Selektionsmedium erfolgte vier Tage bei 28°C in einer Feuchtebox.

### **Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels Vakuuminfiltration**

Die Transformation von *A. thaliana* wurde leicht modifiziert nach der Methode von BECHTOLD *et al.* (1993) durchgeführt.

Zunächst wurden 100 ml YEB-Medium mit transformierten Agrobakterien, die das Plasmid enthielten, welches in die Pflanzen eingebracht werden sollte, angeimpft und über Nacht bei 28°C und 210 rpm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag in einem 1 L-Erlenmeyerkolben mit 300 ml frischem YEB-Medium gemischt und für weitere zwei Tage unter den genannten Bedingungen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Kultur auf sterile 50 ml-Falcon®-Gefäße aufgeteilt und 10 min bei 4 332 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Die so erhaltenen Zellpellets wurden in Infiltrationsmedium (2.9.6) resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in ein 500 ml-Becherglas überführt und in einen Exsikkator gestellt. In die Flüssigkeit wurden die vollständig entwickelten, aber nicht komplett aufgeblühten Infloreszenzen von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gehängt, bevor für 5 min ein Vakuum von etwa 45 mbar (35-40 mm Hg) angelegt wurde. Nach dem Belüften wurden die Pflanzen möglichst schnell unter angefeuchtete Hauben gestellt und über Nacht im Dunkeln bei ca. 16°C inkubiert, um eine Regeneration der durch die Prozedur gestressten Pflanzen zu ermöglichen. Danach wurden die Pflanzen bis zur Samenreife unter Langtag-Bedingungen (22°C und 16 / 8 h Licht / Dunkel-Rhythmus) gehalten. Die reifen Samen wurden von jeder einzelnen Pflanze geerntet und auf MS-Medium mit dem, für den zur Transformation verwendeten Vektor

spezifischen Antibiotikum selektiert. Anschließend wurden die überlebenden Pflanzen pikiert und bis zur Samenreife weiter kultiviert (Details siehe 3.3.2.2). Auch von diesen T<sub>1</sub>-Pflanzen wurden die Samen für jede Pflanze getrennt geerntet. Bei der anschließenden Selektion wurden genau 120 Samen jeder Linie auf eine Selektionsplatte ausgelegt, um die Aufspaltung in der T<sub>2</sub>-Generation leichter feststellen zu können. Es wurde nur mit solchen Linien weitergearbeitet, die eine 3:1 Aufspaltung zeigten, bei denen also  $\frac{3}{4}$  der Nachkommen überlebten. Samen dieser Linien wurden einer letzten Selektion unterzogen, bei der homozygote Linien identifiziert werden sollten. Als Homozygote wurden Linien angesehen, bei denen sämtliche Pflanzen der T<sub>3</sub>-Generation überlebten. Nur mit diesen wurden weiterführende Studien durchgeführt, wie z.B. der Test auf Alliinase-Aktivität (3.10.4.1).

### **Transformation von Tabak-Protoplasten mittels Elektroporation**

Die im Folgenden beschriebene Methode zur Transformation von Tabak-Protoplasten wurde nach CROFTS *et al.* (1999) im Labor von Prof. J. Denecke an der Universität Leeds (UK) durchgeführt.

#### *Protoplasten-Gewinnung*

Blätter aus dem mittleren Bereich des Stengels von steril angezogenen Tabakpflanzen (siehe 3.3.3) der Sorte Petit Havana SR1 wurden mit einem sterilen Skalpell vorsichtig abgetrennt und mit der Blattunterseite nach oben auf eine ebenfalls sterile Petrischale gelegt. Mit Hilfe eines abgeflämmten „Punchers“, der auf etwa 1 cm<sup>2</sup> 80-100 kleine Edelstahlspitzen trägt, wurde die Epidermis der Blattunterseite durchlöchert. Dann wurde der Blattmittelnerv entfernt und die beiden Blatthälften mit der Unterseite nach unten in eine mit 7 ml Lyse-Puffer (2.9.7) gefüllte Petrischale gelegt. Da die für den Zellwandabbau verwendeten Enzyme im Lyse-Puffer unter Sauerstoffmangel eine geringere Aktivität zeigen würden, war darauf zu achten, dass die Blattoberseite nicht benetzt wurde. Zum Abbau der Zellwände wurden die Blätter über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten vorsichtig geschwenkt, um die ersten Protoplasten vom restlichen Blattgewebe zu lösen, bevor sie noch einmal für etwa 30 min stehen gelassen wurden. Die Ernte der Protoplasten begann damit, den gesamten Inhalt der Petrischalen durch eine sterile Nylonmembran mit einer Maschengröße von 100 µm zu filtrieren, um so die Protoplasten vom restlichen Blattmaterial zu trennen. Während dieses Vorgangs und sämtlicher Folgeschritte war unbedingt darauf zu achten, dass die Protoplasten niemals austrockneten. So wurden die Petrischalen und zuletzt auch die Nylonmembran schnellstmöglich mit Elektroporationspuffer (2.9.7) gespült, um sämtliche

Protoplasten in Flüssigkeit aufzunehmen. Anschließend wurde die Protoplasten-Suspension in 50 ml-Falcon®-Gefäße überführt und 15 min bei 100 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 4-15). Da die lebenden Protoplasten nach der Zentrifugation eine Schicht an der Flüssigkeitsoberfläche bilden, sollte die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet werden, damit ein Aufwirbeln der Protoplasten-Schicht verhindert wurde. Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Pasteurpipette wurden dann die am Boden des Gefäßes befindlichen toten Zellen und ein Großteil des TEX-Puffers abgesaugt. Die Protoplasten wurden in Elektroporationspuffer aufgenommen und erneut 10 min bei 100 x g zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde im Folgenden noch zweimal wiederholt, um möglichst viele tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Nach der letzten Zentrifugation wurden den Protoplasten 6 ml Elektroporationspuffer zugegeben und die Suspension wurde mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze und einer 1 ml-Pipette auf 12-14 sterile Halbmikro-Küvetten aufgeteilt.

#### *Elektroporation*

Die zu transformierende DNA wurde mit Elektroporationspuffer auf eine Konzentration von  $30 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  verdünnt. Zu je 500  $\mu\text{l}$  der Protoplasten wurden dann 100  $\mu\text{l}$  der DNA hinzugegeben, gemischt und für etwa 15 min stehen gelassen. Direkt vor der Elektroporation wurden die Ansätze durch schütteln noch einmal gut gemischt, so dass die Protoplasten in der gesamten Flüssigkeit gleichmäßig verteilt waren. Nachdem die Elektroden in die Küvetten eingeführt worden waren, wurden die Protoplasten zur Aufnahme der DNA durch einen Stromstoß von 160 V und 910  $\mu\text{F}$  elektroporiert und für ca. eine halbe Stunde inkubiert. Die Elektroden wurden nach jeder Elektroporation zunächst in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und anschließend in Ethanol gespült, kurz abgeflammt und in Elektroporationspuffer abgekühlt. Im Anschluss wurden die Protoplasten in kleine Petrischalen ( $\varnothing$  35 mm) überführt, wobei die Küvetten mit 1 ml TEX-Puffer ausgespült wurden. Zur Genexpression wurden die Protoplasten über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

#### *Protoplasten-Ernte*

Am darauffolgenden Tag wurden die Protoplasten in sterile glasklare 14 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min ohne Bremse bei 100 x g (Zentrifuge Sigma 4-15) und Raumtemperatur zentrifugiert. Sollten die Zellen lediglich mikroskopiert werden, wurden der Puffer und sämtliche tote Zellen mit Hilfe einer gezogenen Pasteurpipette entfernt. Diente die  $\alpha$ -Amylase als Reporter gen, mussten im Anschluss Aktivitätstests durchgeführt werden, bei denen die Aktivität im Puffer mit der in den Zellen verglichen werden sollte (siehe 3.10.4.2). Aus diesem Grund

wurden in diesem Fall einige Milliliter des Puffers in ein vorgekühltes steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Röhrchen mit 250 mM NaCl-Lösung aufgefüllt, geschwenkt und erneut für 5 min bei 100 x g und Raumtemperatur, diesmal jedoch mit Bremse, zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe und einer Pasteurpipette abgenommen und die Zellen bis zum Aufschluss entweder kurz auf Eis oder für längere Zeit bei -80°C gelagert.

Die extrazelluläre Probe (Puffer) wurde 10 min bei 18 000 x g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 1-15K) und der Überstand, 1:1 mit Amylase-Extraktionspuffer (2.9.7) verdünnt, zur Aktivitätsmessung eingesetzt (siehe 3.10.4.2). Im Gegensatz dazu mussten die Zellen für die intrazelluläre Probe zunächst aufgeschlossen werden. Hierzu wurde den Zellen nach der Lagerung 450 µl Amylase-Extraktionspuffer zugegeben und die Suspension in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Mit Hilfe eines Ultraschall-Impulses für 5 sec (Soniprep 150 MSE) wurden die Zellen homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 18 000 x g und 4°C (Zentrifuge Sigma 1-15K), um die Zelltrümmer zu sedimentieren, bevor der Überstand bis zum Aktivitätstest auf Eis gelagert wurde.

### *Mikroskopie*

Die mikroskopische Betrachtung der GFP-exprimierenden Protoplasten wurde mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Die Anregungswellenlänge lag bei 488 nm und der Emissionsbandpassfilter wurde auf 500-550 nm eingestellt. Die Protoplasten wurden mit Vergrößerungen von 400-1000-fach mikroskopiert.

### **Transformation von Zwiebelzellen mittels „Particle bombardment“**

Um das GFP-Gen transient in Zwiebelepidermiszellen zu exprimieren, wurden die entsprechenden Plasmide mittels Partikel-Beschuss in die Zellen eingebracht. Zunächst mussten die Goldpartikel, die später mit DNA beladen werden sollten, gereinigt werden. Hierzu wurden 50 mg der Partikel in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gevortext, für 1 min im Ultraschallbad belassen und anschließend kurz zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C). Diese Prozedur wurde noch einmal mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und danach mit 100%-igem Ethanol wiederholt, bevor die Goldpartikel in 1 ml sterilem 50%-igem Glycerin aufgenommen wurden. Zum Beladen des Golds wurden 50 µl der gewaschenen Partikel zu 5 µl Plasmid-DNA (1 µg µl<sup>-1</sup>) gegeben und für 3 min gevortext. Dann wurden fünfmal 10 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt, wobei nach jeder Zugabe für 15 sec gemixt wurde. Bevor nach demselben Verfahren viermal 5 µl 0,1 M Spermidin

zugegeben wurden, wurde noch einmal 3 min lang gevortext. Auch im Anschluss an die Spermidin-Zugabe wurde wiederum 3 min gevortext. Es folgte eine kurze Zentrifugation, nach der der Überstand entfernt und 140  $\mu$ l kaltes 70%-iges Ethanol auf die Goldpartikel gegeben wurde. Dann wurde die Suspension gut gemischt und für 2 min zentrifugiert, so dass das Ethanol entfernt und die beschichteten Partikel in 50  $\mu$ l 100%-igem Ethanol resuspendiert werden konnten. Je 6  $\mu$ l des Gemischs wurden auf kleine Kunststoffnetze gegeben, die anschließend in die entsprechende Halterung der Beschusskammer geschraubt wurden. Unter einem Vakuum von 900 mbar wurden die Partikel mittels Helium mit einem Druck von 6 bar von den Netzen auf die darunter befindlichen Zwiebelstücke „geschossen“, welche auf H<sub>2</sub>O-Agar lagen. Zur Expression des GFP wurden die Zwiebelstücke in einer Feuchtekammer für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Leica DM R) betrachtet (Anregung bei 490 nm, Emissionsfilter: 510 nm).

### 3.9.4 Klonierung der Alliinase aus *Allium sativum*

Die Klonierung der Alliinase aus Knoblauch bis hin zur Synthese in den Zielorganismen setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen.

- 1) RNA-Isolation aus Knoblauchzehen
- 2) cDNA-Synthese
- 3) Amplifikation der gewünschten Sequenz mittels PCR (im Falle der Fusion an GFP bzw.  $\alpha$ -Amylase bestand dieser Schritt aus mehreren PCR (siehe 3.9.3.3, assembly PCR))
- 4) Ligation des PCR-Produktes in pGEM-TEasy und Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  zur Vermehrung
- 5) Isolation der Plasmide aus 10-12 Klonen (Mini-Präparation) und Kontrollrestriktion zur Überprüfung des Einbaus der Alliinase-Sequenz in den Vektor
- 6) Sequenzierung durch die Firma SeqLab (Göttingen)
- 7) Ligation korrekter DNA-Fragmente in Expressionsvektor und Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$
- 8) Isolation der Plasmide aus 10-12 Klonen (Mini-Präparation) und Kontrollrestriktion zur Überprüfung des Einbaus der Alliinase-Sequenz in den Vektor
- 9) Transformation von Hefe RS453 (pFL61) oder Tabak-Protoplasten zur Expression (pAMY, pGFP) oder von *A. tumefaciens* GV3101 zur anschließenden Transformation von *A. thaliana* (pCHF1)

Die im Folgenden dargestellte Tabelle soll eine Übersicht über die hergestellten Vektoren geben.

Bezeichnung	Referenz-Sequenz (NCBI Nummer)	Klonierte Alliinase-Sequenz (bp)	Beschreibung	Zur Amplifikation verwendete Primer	Genutzte Annealing-Temp.	Zur Klonierung verwendete Schnittstellen
pCHF1/Al	<u>S73324</u> RABINKOV <i>et al.</i> 1994	166-1509	Zur Synthese der Alliinase ohne Signalsequenz in <i>A. thaliana</i> → Aktivitätsmessung	Alfwd + Alrev	68°C	<i>Sal</i> I <i>Pst</i> I
pCHF1/Al+TS2	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	13-1470	Zur Synthese der Alliinase mit langer Signalsequenz und 10 folgenden Aminosäuren in <i>A. thaliana</i> → Aktivitätsmessung	Al+TS2/ <i>Sal</i> I + Alrev	68°C	<i>Sal</i> I <i>Pst</i> I
pGEM-TEasy/Al_Sonde	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	229-761	Zur Herstellung einer RNA-Sonde zum Nachweis der Alliinase-Expression	Al_Sondefwd + Al_Sonderev	50°C	
pFL61/Al	<u>S73324</u> RABINKOV <i>et al.</i> 1994	166-1509	Zur Synthese der Alliinase ohne Signalsequenz in <i>S. cerevisiae</i> → Aktivitätsmessung	Alfwd + Alrev	68°C	<i>Not</i> I
pFL61/Al+TS2	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	13-1470	Zur Synthese der Alliinase mit langer Signalsequenz und 10 folgenden Aminosäuren in <i>S. cerevisiae</i> → Aktivitätsmessung	Al+TS2/ <i>Sal</i> I + Alrev	68°C	<i>Not</i> I
pAMY+TS-K	<u>S73324</u> RABINKOV <i>et al.</i> 1994	88-132	Zur Synthese einer Alliinase- $\alpha$ -Amylase-Fusion mit kurzer Signalsequenz in Tabak-Protoplasten → Lokalisation	<i>PCR1+2</i> : TSfwd_NcoI + TS/2rev+Amy, Amy_fwd + PUCOFmod  <i>PCR3 (nach Assembly)</i> : TSfwd_NcoI + PUCOFmod	50°C	<i>Nco</i> I <i>Hind</i> III

pAMY+TS-L	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	13-96	Zur Synthese einer Alliinase- $\alpha$ -Amylase- Fusion mit langer Signalsequenz in Tabak-Protoplasten → Lokalisation	<i>PCR1+2:</i> TS2fwd_NcoI + TS/2rev+Amy, Amy_fwd + PUCOFmod  <i>PCR3 (nach Assembly):</i> TS2fwd_NcoI + PUCOFmod	50°C	<i>Nco I</i> <i>Hind III</i>
pAMY +Alipro	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	13-129	Zur Synthese einer Alliinase- $\alpha$ -Amylase- Fusion mit langer Signalsequenz und 10 folgenden Aminosäuren in Tabak-Protoplasten → Lokalisation	<i>PCR1+2:</i> 35SProm + Alipro-AS, Aliproamy-S + PUCOF  <i>PCR3 (nach Assembly):</i> 35SProm + PUCOF	50°C	<i>Nco I</i> <i>Hind III</i>
pGFP +Alipro	<u>Z12622</u> VAN DAMME <i>et al.</i> 1992	13-129	Zur Synthese einer Alliinase-GFP-Fusion mit langer Signalsequenz und 10 folgenden Aminosäuren in Tabak-Protoplasten und Zwiebelzellen → Lokalisation	<i>PCR1+2:</i> 35SProm + Alipro-AS, AliproGFP-S + PUCOF  <i>PCR3 (nach Assembly):</i> 35SProm + PUCOF	50°C	<i>Nco I</i> <i>Hind III</i>

Tab. 6: Information über Vektorkonstruktionen für die Expression des Alliinasegens in Fremdorganismen und zur Alliinase-Lokalisation

### 3.9.5 Transkriptanalyse

#### 3.9.5.1 Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonde

Als Erstes musste das Sequenzstück, welches später als Sonde dienen sollte (siehe Anhang 1), mittels PCR amplifiziert werden. Hierzu wurden die folgenden Komponenten in einem PCR-Gefäß zusammengegeben.

10 µl Red Taq<sup>TM</sup> Ready Mix<sup>TM</sup>  
1 µl Plasmid (welches die vollständige Sequenz enthält)  
1 µl Primer Al\_Sondefwd (10 µM)  
1 µl Primer Al\_Sonderev (10 µM)  
7 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler wie unter 3.9.3.3 beschrieben.

Anschließend wurde die korrekte Größe des Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, die DNA aus dem Gel aufgereinigt und in den Klonierungsvektor pGEM-TEasy ligiert. Die genaue Durchführung der genannten Schritte wurde bereits in den Kapiteln 3.9.1.5, 3.9.3.7 und 3.9.3.8 erläutert. Im Anschluss an die Ligation wurde der Vektor zur Vermehrung in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingebracht (siehe Kapitel 3.9.3.9). Nachdem mehrere Klone gepickt und über Nacht in Flüssigkultur angezogen worden waren, wurde eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab durchgeführt (siehe Kapitel 3.9.1.1) und die gewonnenen Plasmide mittels Restriktion und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Zwei der Plasmide, die das eingefügte DNA-Fragment zu enthalten schienen, wurden zur Sequenzierung geschickt (SeqLab Göttingen), um die Orientierung des eingebrachten Sequenzstückes feststellen zu können. Es folgte eine weitere PCR, bei der die im Vektor enthaltene Bindungsstelle für die RNA-Polymerase mit amplifiziert werden sollte. Hierzu wurde der im Folgenden aufgelistete Ansatz zusammenpipettiert und eine PCR mit 30 Zyklen durchgeführt.

20 µl Red Taq<sup>TM</sup> Ready Mix<sup>TM</sup>  
2 µl Plasmid  
2 µl M13 Primer fwd (-40) (4 µM)  
2 µl M13 Primer rev (4 µM)  
14 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (steril)

Nachdem das Amplifikat mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und, wie in Kapitel 3.9.1.5 beschrieben, aus dem Gel extrahiert worden war, wurde das DNA-Fragment mit Hilfe einer *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben. Dabei wurde die produzierte RNA mit DIG (Digoxigenin) markiert, das später zur Sichtbarmachung der gebundenen Sonde genutzt wurde (siehe Kapitel 3.9.5.3). Es wurden

2  $\mu$ l RNA-Polymerase-Puffer (10x)

2  $\mu$ l NTP+DIG

5  $\mu$ l DNA

1  $\mu$ l RNase-Inhibitor

8  $\mu$ l DEPC-behandeltes Wasser

zusammengegeben und gut gemischt, bevor 2  $\mu$ l SP6 RNA-Polymerase hinzugefügt wurden und das Reaktionsgemisch für 2 h bei 37°C inkubiert wurde. Durch Zugabe von 80  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser und Einfrieren bei -80°C wurde die Reaktion gestoppt. Die entstandene Sonde wurde durch eine weitere Agarose-Gelelektrophorese überprüft und bis zum Gebrauch für die Northern Blot-Analyse bei -80°C gelagert.

### 3.9.5.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Bevor die RNA mit Hilfe der Northern Blot Analyse untersucht werden konnte, musste sie zunächst durch eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines kleinen 1,5%-igen Gels mussten 1,5 g Agarose in 95 ml 1x MOPS (2.9.8) aufgelöst und mit 5 ml Formaldehyd-Lösung (37%) gemischt werden. Etwa 10  $\mu$ g RNA (maximales Volumen 10  $\mu$ l) wurden mit 30  $\mu$ L RNA-Ladepuffer (2.9.8) versetzt, zur Denaturierung 5 min auf 98°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese in 1x MOPS bei 90-95 V. Die Auftrennung der RNA konnte durch das im Ladepuffer enthaltene Ethidiumbromid mittels UV-Licht überprüft und mit Hilfe einer Polaroid-Kamera dokumentiert werden.

### 3.9.5.3 Northern Blot Analyse

#### *Blotting*

Beim sogenannten Blot-Verfahren wird die elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch einen aufwärtsgerichteten Kapillar-Transfer vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert. Als Transfer-Puffer diente 25 mM Natrium-Phosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt, dessen Enden in den Transfer-Puffer

reichten, so dass das Papier den Puffer aufsaugen konnte. Das Gel wurde mit der Nylonmembran bedeckt, auf die eine weitere Lage Filterpapier und mehrere Schichten Papierhandtücher gelegt wurden, wodurch der Puffer aufwärts gesogen werden sollte. Durch diesen Vorgang wurde die RNA über Nacht aus dem Gel gelöst und auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die RNA im Cross-linking-Verfahren durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 125 mJ auf der Membran fixiert.

#### *Prä-Hybridisierung und Hybridisierung*

Zur Prä-Hybridisierung, die zum Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran diente, wurde die Membran 1 h bei 68°C mit DIG Easy Hyb-Puffer inkubiert. Während dieser Zeit wurden 5 µl der DIG-markierten Sonde (Herstellung siehe 3.9.5.1) mit 50 µl DIG Easy Hyb-Puffer gemischt, 10 min auf 98°C erhitzt, um die RNA-Sonde zu denaturieren, und auf Eis abgekühlt. Nach der Prä-Hybridisierung der Membran wurde die so vorbereitete Sonde in 5 ml DIG Easy Hyb-Puffer gegeben, welcher auf 68°C vorgewärmt war und auf die Membran gegeben. Es folgte die Hybridisierung über Nacht bei 65°C, während derer die Sonde an die spezifische RNA-Sequenz binden sollte.

#### *Immunodetektion*

Durch die DIG-Markierung der Sonde war es möglich, die gebildeten Hybride mit Hilfe von DIG-spezifischen Antikörpern, an die wiederum eine alkalische Phosphatase gekoppelt war, zu detektieren. Bei der Reaktion der Phosphatase mit dem Substrat wird Chemilumineszenz freigesetzt, die durch Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann. Zunächst musste die Membran jedoch in mehreren Schritten gewaschen und freie Bindungsstellen blockiert werden. Dazu wurde die Nylonmembran zweimal für 5 min in 2x SSC / 0,1% SDS-Lösung (2.9.9) bei Raumtemperatur geschwenkt, um überschüssige Sonde zu entfernen. Daran schlossen sich drei 20-minütige Waschschrte mit 0,1x SSC / 0,1% SDS-Lösung bei 60°C an, bei denen unspezifische Hybride gelöst wurden. Bevor die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Zugabe von 1x Blocking-Reagenz (2.9.9) und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur gesättigt wurden, wurde die Membran noch 1 min in 1x Waschpuffer (2.9.9) geschwenkt. Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen wurde der Anti-DIG-Antikörper 1:10 000 in 1x Blocking-Reagenz verdünnt und auf die Membran gegeben. Zur Bindung der Antikörper an das Digoxigenin wurde für 1 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken inkubiert. Im Anschluss daran wurde dreimal für 15 min mit 1x Waschpuffer + 0,3% Tween 20 gewaschen. Bevor die Reaktion der alkalischen Phosphatase durch Auftropfen der

CSPD®-Lösung auf die Membran gestartet wurde, wurde die Membran für 2 min in 1x Substratpuffer äquilibriert. Anschließend wurde sie zwischen zwei Folien eingeschweißt und in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Der Röntgenfilm wurde für 20-35 min bei 37°C exponiert, bevor er entwickelt wurde.

## 3.10 Isolation und Analyse von Proteinen

### 3.10.1 Proteinextraktion aus Hefe

#### 3.10.1.1 Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot

Um einen Gesamt-Proteinextrakt für die anschließende Analyse mittels SDS-Page und Western Blot (siehe 3.10.4) herzustellen, wurden die Hefe-Klone zunächst über Nacht in 30 ml Selektionsmedium (YNBD ohne Uracil; 2.8.2) bei 28°C und 210 rpm angezogen. Am folgenden Tag wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und 10 OD<sub>600</sub> (d.h. bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 20 ml) der Kultur in ein 50 ml-Falcon®-Gefäß überführt und bei 693 x g für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Die Pellets wurden in 200 µl 2x Laemmli-Puffer (2.9.10) resuspendiert und in ein mit etwa 100 µl Glaskugeln (ø ca. 0,5 mm) gefülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nach 2-minütigem Vortexen wurden die Proben zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend 1 min bei 15 700 x g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415C). Die Überstände konnten entweder sofort analysiert oder bei -20°C gelagert werden.

#### 3.10.1.2 Zur Ermittlung der Enzymaktivität transgener Alliinase

Sollte im Anschluss an die Aufreinigung ein Alliinase-Aktivitätstest durchgeführt werden, bedurfte es eines aufwendigeren Extraktionsvorganges, der in Anlehnung an eine von WEIK *et al.* (1998) veröffentlichte Methode durchgeführt wurde. Dabei lag das Protein am Ende in einer reineren Form vor und durch mehrfachen Wechsel des pH-Wertes, sollte eine Rückfaltung der transgenen Alliinase hervorgerufen werden.

Auch bei dieser Methode wurde zunächst eine Über-Nacht-Kultur der Hefe-Klone angezogen, in diesem Fall jedoch in einem größeren Volumen (100 ml YNBD ohne Uracil). Sobald die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 erreicht hatten, wurden sie auf mehrere 50 ml-Falcon®-Gefäße aufgeteilt und bei 693 x g für 15 min zentrifugiert (Megafuge 1.OR). Die Pellets derselben Klone wurden in 5 ml YNBD ohne Uracil vereint und in ein 15 ml-Falcon®-Gefäß, in dem sich etwa 2 ml Glaskugeln (ø ca. 0,5 mm) befanden, überführt. Um die Zellen aufzuschließen wurde dreimal für je 3 min kräftig gevortext. Zwischendurch wurden die Zellen auf Eis abgekühlt. Es

folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 6238 x g und 4°C (Megafuge 1.OR) und die anschließende Aufnahme der Pellets in je 6 ml frisch angesetzte 2,5 M Urea-Lösung. Nach einer weiteren 15-minütigen Zentrifugation bei 6238 x g und 4°C wurden die Zellbestandteile in 6 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Pellets in je 6 ml 2,5% Zwittergent 3-14 (in 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) + 25 µM Pyridoxal-5-Phosphat) aufgenommen und durch Zugabe von NaOH der pH-Wert auf 12,0 erhöht. Nachdem die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert worden waren, wurde der pH-Wert durch HCl auf 8,0 gesenkt. Die Extrakte wurden dann erneut für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Dann wurden die Suspensionen noch einmal 15 min bei 6238 x g zentrifugiert (Megafuge 1.OR) und die Überstände jeweils auf zwei frische 15 ml-Falcon®-Gefäße aufgeteilt. Es folgte eine schrittweise Verdünnung bis zu einem Verhältnis von 1:64 mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8,0) + 25 µM Pyridoxal-5-Phosphat, dem noch Glutathion hinzugefügt wurde (1 mM GSH + 0,5 mM GSSG), um die Enzymaktivität zu steigern. Auch die Verdünnungsschritte sollten der Rückfaltung des Proteins dienen. Bis zur Analyse wurden die Proben auf Eis gehalten.

### 3.10.2 Proteinextraktion aus Pflanzen

#### 3.10.2.1 Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot

Für die Analyse mittels SDS-Page und anschließendem Western Blot (siehe 3.10.4) wurden die Proteine aus Pflanzen ähnlich extrahiert, wie für die Aufarbeitung der Hefe-Proteine beschrieben. So wurden 200 mg unter flüssigem Stickstoff gemörserten Blattmaterials in ein mit 200 µl 2x Laemmli-Puffer (2.9.10) gefülltes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und kräftig gevortext. Bevor die Proben 10 min bei 15 700 x g und Raumtemperatur zentrifugiert wurden (Eppendorf Centrifuge 5415C), wurden sie 5 min bei 95°C denaturiert. Der Überstand konnte entweder direkt analysiert oder bei -20°C gelagert werden.

#### 3.10.2.2 Zur Ermittlung der Alliinase-Enzymaktivität

Sowohl aus Knoblauchzehen als auch aus *Arabidopsis*-Blättern wurde für die Messung der Alliinase-Aktivität ein Proteinextrakt nach dem folgenden Protokoll hergestellt.

Eine geschälte Knoblauchzehe bzw. 15 möglichst junge *Arabidopsis*-Blätter wurden in gekühlte Mörser gegeben und nach Zugabe von einer Spatelspitze feinem Sand und 1,5 ml eisgekühltem Alliinase-Vollpuffer (2.9.10) homogenisiert. Direkt im Anschluss wurden die Proben 30 min bei 11 000 x g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R), um Zelltrümmer zu sedimentieren. Während dieser Zeit wurde der Dialyse-Schlauch (ZelluTrans 12, OS 25 mm,

MWCO 12 000-14 000) 15 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gequollen und von innen und außen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gespült. Nach der Zentrifugation wurde der Probenüberstand in den vorbereiteten Dialyseschlauch gegeben und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  unter leichtem Rühren gegen Alliinase-Vollpuffer dialysiert, um störende Salze aus dem Proteinextrakt zu eliminieren. Anschließend konnte die Protein-Lösung in vorgekühlte Reaktionsgefäße gefüllt und entweder sofort für Aktivitätstest verwendet oder für mehrere Tage bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 3.10.3 Proteinmengenbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951)

Bei der Proteinmengenbestimmung nach Bradford kann es zu einem fehlerhaften Ergebnis kommen, da es sich bei der Alliinase um ein Glykoprotein handelt und die Bindung des Farbstoffes bei dieser Methode durch die Glykohülle gestört werden kann (KREST 2000). Aus diesem Grund wurde die Proteinmenge in der vorliegenden Arbeit nach der Methode von LOWRY *et al.* (1951) bestimmt. Diese besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Im ersten bildet sich ein blau-violetter Komplex zwischen dem Stickstoff der Proteine und Kupfer(II)-Ionen, die in einer alkalischen Lösung zugegeben werden. Dieser Komplex reduziert im zweiten Schritt das gelbe Folin-Ciocalteus-Reagenz, wodurch eine intensive Blaufärbung entsteht, die zur Quantifizierung des Proteins genutzt werden kann.

Sowohl der Reaktionsansatz als auch die spektrophotometrische Messung erfolgte in Halbmikro-Küvetten. Zur Eichung diente eine Verdünnungsreihe von 0 bis  $100\ \mu\text{g}$  BSA. Dazu wurden 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und  $100\ \mu\text{l}$  einer BSA-Stammlösung ( $1\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$ ) vorgelegt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf ein Endvolumen von  $100\ \mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden die Extrakte, deren Proteingehalt bestimmt werden sollte, 5- und 10-fach mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  verdünnt. Von jeder der Verdünnungen wurden ebenfalls  $100\ \mu\text{l}$  in die Küvetten pipettiert. Durch Zugabe von  $335\ \mu\text{l}$  Lowry-Gebrauchslösung (2.9.11) wurde die erste Reaktion gestartet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor durch Hinzugeben von  $1\ \text{ml}$  Folin-Gebrauchslösung (2.9.11) die zweite Reaktion induziert wurde. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde zunächst durch Messen der BSA-Verdünnungsreihe bei  $540\ \text{nm}$  die Eichkurve ermittelt, um im Anschluss daran die Proteingehalte der verdünnten Proben zu bestimmen.

### 3.10.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

#### *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)*

Die Proben wurden wie unter 3.10.1.1 und 3.10.2.1 beschrieben aufgearbeitet. Durch das Erhitzen und die Zugabe des Laemmli-Puffers wurden die Proteine denaturiert. Dabei dient die

Hitze dazu Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen. Das im Puffer befindliche  $\beta$ -Mercaptoethanol sorgt für eine Reduktion der Disulfidbrücken, die dadurch gespalten werden. Um die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts und nicht durch ihre Eigenladung aufzutrennen, gibt man sowohl dem Laemmli-Puffer als auch dem Gel das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zu. Dies bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, so dass seine stark negative Ladung alle Ladungen der Proteine nivelliert und in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind. Das zur Auftrennung verwendete Gel setzt sich aus zwei Gelen unterschiedlicher Porengröße zusammen. So werden die Proben zunächst im großporigen Sammelgel konzentriert, um sie dann im feinporigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 5%-ige Sammelgele und 10%- bzw. 16%-ige Trenngele verwendet, deren genaue Zusammensetzung den folgenden Tabellen (Tab. 7 und 8) zu entnehmen ist.

<b>Trenngel</b>	10%	16%
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	6,7 ml	4 ml
3 M Tris-HCl pH 8,8	2 ml	2 ml
30% Acrylamid (29:1)	5,3 ml	8 ml
10% SDS	0,16 ml	0,16 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,14 ml	0,14 ml

Tab. 7: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-Page (ausreichend für 2 Gele bei einer Dicke von je 1 mm)

<b>Sammelgel</b>	5%
20% Saccharose	11,3 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml
30% Acrylamid (29:1)	2,5 ml
10% SDS	0,15 ml
TEMED	0,03 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml

Tab. 8: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-Page (ausreichend für min. 2 Gele bei einer Dicke von je 1 mm)

Nachdem das Gel mit 15  $\mu$ l der in Laemmli-Puffer aufgenommenen Proteinextrakten beladen worden war, wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Die Zusammensetzung des verwendeten Laufpuffers ist Kapitel 2.9.12 zu entnehmen

### *Western Blot*

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Semidry-Blotting-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurden drei Lagen in Blotting-Puffer (2.9.12) getränktes Filterpapier auf den unteren Teil des Blotting-Geräts gelegt. Darauf kam die ebenfalls mit Blotting-Puffer benetzte Nitrozellulose-Membran. Nachdem das Sammelgel vorsichtig abgetrennt worden war, wurde das Gel auf die Membran gelegt und mit drei Lagen feuchtem Filterpapier bedeckt. Bevor der obere Teil des Blotting-Gerätes aufgesetzt und die Proteine durch Anlegen eines Stroms von 65 mA pro Gel ( $\sim 1 \text{ mA cm}^{-2}$  Gel) für 1,5 h auf die Membran übertragen wurden, wurden mögliche Luftblasen durch Überrollen des Papiers mit einer Glasflasche entfernt. Anschließend wurde der Transfer durch eine Ponceau-Färbung der Membran, bei der sämtliche Proteinbanden unspezifisch angefärbt werden, überprüft. Hierzu wurde die Membran für wenige Minuten in der Ponceau-Färbelösung inkubiert und im Anschluss daran solange mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Um die Färbung wieder zu entfernen und die Membran für die folgende Immunodetektion vorzubereiten, wurde sie in 1x PBS + 0,5 % Tween 20 (2.9.12) gelegt, bis die Banden nicht mehr zu sehen waren.

### *Immunodetektion*

Zu Beginn der Immunodetektion wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch eine Inkubation über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung (2.9.12) abgesättigt. Am folgenden Tag wurde nach mehrfachem Waschen in 1x PBS + 0,5 % Tween 20 und 1x PBS, der Primär-Antikörper, welcher spezifisch an die Alliinase binden sollte, 1:10 000 in 1x PBS + 1 % BSA verdünnt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 1,5 h bei Raumtemperatur wurde der überschüssige Anti-Alliinase-Antikörper durch fünf je 5-minütige Waschschriffe mit 1x PBS + 0,5 % Tween 20 entfernt. Bei dem Sekundär-Antikörper handelte es sich um einen Anti-Kaninchen-Antikörper, der an den in Kaninchen produzierten Anti-Alliinase-Antikörper binden sollte. Die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase aus Meerrettich ermöglichte die spätere Detektion der vom Anti-Alliinase-Antikörper erkannten Proteinbanden. Der Sekundär-Antikörper wurde 1:10 000 in Blockierungslösung verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Anschließend wurde erneut fünfmal 5 min mit 1x PBS + 0,5 % Tween 20 und ebenfalls fünfmal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschriffe wurden je 10 ml ECL1- und ECL2-Lösung (2.9.12) gleichzeitig auf die Membran gegossen und für 1-2 min inkubiert. Dann wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Röntgenfilm-Kassette gelegt. Die ECL-Lösung (ECL = Enzymatische Chemilumineszenz) beinhaltete das

Substrat für die an den Antikörper gebundene Peroxidase, das Luminol. Dieses wird von dem Enzym in seine oxidierte Form überführt, wobei Chemilumineszenz freigesetzt wird, die durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann. Der Röntgenfilm wurde je nach Intensität der Signale zwischen 1 und 60 min exponiert und anschließend entwickelt.

### 3.10.5 Enzymaktivitätstests

#### 3.10.5.1 Alliinase-Assay (modifiziert nach SCHWIMMER & MAZELIS (1963))

Der zur Bestimmung der Alliinase-Aktivität verwendete Assay setzt sich aus zwei hintereinander geschalteten Enzymreaktionen zusammen. Die erste Reaktion setzt die Aktivität der Alliinase voraus, durch die das Alliin zu Allicin umgesetzt wird. Im Verlauf dieser Reaktion wird außer Allicin auch Pyruvat frei gesetzt. Dieses dient in der zweiten Reaktion als Substrat für die Lactatdehydrogenase, bei der das Pyruvat unter Verbrauch von NADH zu Lactat umgesetzt wird. Die Abnahme des NADH in der Lösung kann bei 340 nm photometrisch verfolgt werden. Dabei ist der NADH-Verbrauch direkt proportional zum Alliin-Umsatz und erlaubt somit eine Aussage zur Geschwindigkeit der Alliinase-Reaktion. Um sicherzustellen, dass die Alliinase-Reaktion die Geschwindigkeit bestimmt, wurden alle anderen Komponenten im Überschuss zugegeben. Zur Bestimmung der Alliinase-Aktivität wurden die Proben wie unter 3.10.1.2 und 3.10.2.2 beschrieben vorbereitet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen, wobei der Puffer (TEA-HCl) im Wasserbad auf 25°C temperiert wurde.

10 µl 7,5 mM NADH  
900 µl 0,1 M TEA-HCL (pH 7,6)  
50 µl Alliin (50 mM bei Hefe; 350 mM bei Arabidopsis-Extrakten)  
20 µl Lactatdehydrogenase (8 µg ml<sup>-1</sup>)  
50 µl Probe

Vor Zugabe der Probe wurde der Ansatz kurz gemischt, um die Aktivitätsmessung ohne Verzögerung direkt nach Hinzufügen des Proteinextrakts starten zu können. Die Änderung der Absorption bei 340 nm wurde für eine Dauer von 10 min aufgezeichnet (Spektrophotometer DU® 800).

### 3.10.5.2 $\alpha$ -Amylase-Assay

Die Messung der Aktivität der  $\alpha$ -Amylase wurde mit Hilfe des „Cereal  $\alpha$ -amylase assay“ (Megazyme) durchgeführt. Hierbei trägt das zur Messung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität eingesetzte Substrat *p*-Nitrophenol-Maltoheptaosid (BPNPG7) am nicht reduzierenden Ende eine 4,6-O-verknüpfte Benzylidengruppe, so dass seine Hydrolyse durch  $\beta$ -Amylase, Glucoamylase und  $\alpha$ -Glucosidase blockiert wird. Erst nach der Hydrolyse einer  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Bindung innerhalb des Oligomers durch die  $\alpha$ -Amylase wird das entstandene *p*-Nitrophenyl-Maltosaccharid durch Glucoamylase und  $\alpha$ -Glucosidase in Glucose und *p*-Nitrophenol gespalten. Durch die Zugabe von 1% Tris wird die Reaktion gestoppt, und es kommt in Verbindung mit dem gebildeten *p*-Nitrophenol zu einer gelben Färbung. Dadurch kann die Konzentration des freigesetzten *p*-Nitrophenols photometrisch bestimmt werden.

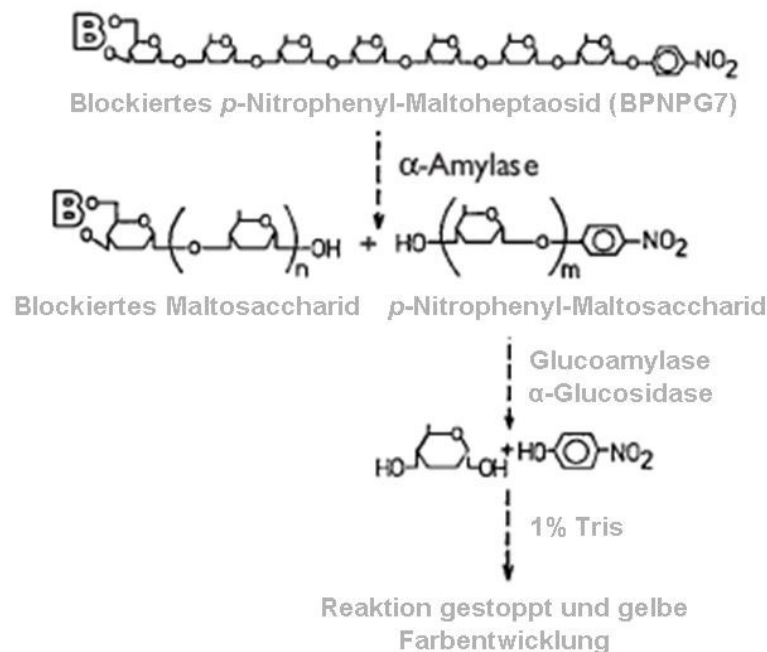


Abb. 13: Reaktionsschema des  $\alpha$ -Amylase-Assays

Die Aufarbeitung der Proben wurde bereits in Verbindung mit der Transformation von Tabak-Protoplasten in Kapitel 3.9.3.9 erläutert. 30  $\mu$ l dieser Extrakte wurden zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität mit 30  $\mu$ l Substrat-Lösung (2.9.13) versetzt und bei 45°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 150  $\mu$ l 1% Tris (w/v) hinzugegeben. Anschließend wurden 200  $\mu$ l des Ansatzes in eine 96-well-Platte gegeben und die Absorption bei 405 nm gemessen (Anthos 2010 Elisa Reader).

### 3.11 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms „SigmaStat® 3.1“ (SYSTAT Software 2004). Hierbei wurden die Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Waren die Daten normalverteilt und bestand eine Varianzhomogenität der Gruppenmittelwerte, so wurden die Gruppen mit parametrischen Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei kam entweder der t-Test zum Einsatz oder, bei mehr als zwei Varianten, die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Lag keine Normalverteilung und / oder Varianzhomogenität vor, erfolgte die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Varianten entweder mit dem Mann-Whitney Rank Sum-Test bei zwei Gruppen oder dem H-Test nach Kruskal und Wallis (ANOVA on Ranks) bei mehr als zwei Gruppen. Ergab diese Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, schloss sich ein Post hoc-Test an, um festzustellen, welche Varianten voneinander verschieden sind (ebenfalls  $p \leq 0,05$ ). Als Post hoc-Tests wurde entweder die Dunn´s Methode oder der Tukey-Test verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung eines Analyseverfahrens zur Bestimmung des Allicingehalts in Knoblauchsaff

Wie bei CURTIS *et al.* (2004) beschrieben, ist es möglich mit Hilfe eines *E. coli*-Bioassays anhand der Hemmhofgröße den Allicingehalt in Knoblauchsaff abzuschätzen. Die Autoren nutzten eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der Thiosulfinat-Konzentration nach HAN *et al.* (1995). Da Allicin, laut LAWSON *et al.* (1991), 60-80% der Thiosulfinate in Knoblauch ausmacht, konnte die Menge an Allicin, durch die Multiplikation des ermittelten Thiosulfinat-Gehalts mit 0,7 berechnet werden. Auf diese Weise kalibrierten CURTIS *et al.* (2004) den beschriebenen *E. coli*-Assay mit den Werten des spektrophotometrischen Assays und konnten den Bioassay so zur Abschätzung des Allicingehalts in Knoblauchsaff einsetzen.

Da bei dem von CURTIS *et al.* (2004) verwendeten spektrophotometrischen Assay sämtliche Thiosulfinate des Knoblauchsaffes nachgewiesen werden, ist die Abschätzung des Allicingehalts mit dieser Methode recht ungenau. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur zuverlässigeren Quantifizierung des Allicins etabliert werden.

#### 4.1.1 HPLC

In Anlehnung an ein von I. KREST (2000) in seiner Dissertation veröffentlichtes Protokoll zum Allicin-Nachweis mittels HPLC wurde die unter 3.2.2 beschriebene Methode entwickelt. Durch die Kalibration mit Hilfe eines Allicin-Standards konnte der Allicingehalt der injizierten Proben vom verwendeten Programm (Geminyx 1.91) durch Integration der Peakfläche berechnet werden. Abbildung 14 A zeigt ein typisches Chromatogramm von verdünntem und mit dem internen Standard 4-Hydroxybenzoesäurebutylester versetzten Knoblauchsaff bei 254 nm. Die Peak-Identifikation erfolgte computergestützt anhand der Retentionszeit. Hierzu wurden während der Kalibration die Retentionszeiten der Standards gespeichert. So konnte das Geminyx-Programm die Peaks der Probe durch einen Vergleich ihrer Retentionszeiten mit denen der Standards den entsprechenden Substanzen zuordnen.

Die Retentionszeit wird durch viele Faktoren, wie z.B. Laufmittel oder Druck, beeinflusst. Somit ist es möglich, dass sie, etwa durch eine geringe Veränderung des Verhältnisses von Methanol zu Wasser im Laufmittel, um mehrere Sekunden verschoben wird. In solchen Fällen war ein

Vergleich der Spektren der Standards mit denen der zu identifizierenden Peaks hilfreich. In den Abbildungen 14 B und C sind die Spektren der in Abbildung 14 A als Allicin bzw. 4-Hydroxybenzoesäurebutylester bezeichneten Peaks dargestellt. Beide Spektren wurden mit denen der Standards verglichen und das Spektrum des Standards, das am besten mit dem der zu identifizierenden Substanz übereinstimmte, wurde als zweite Kurve in die Grafik aufgenommen.

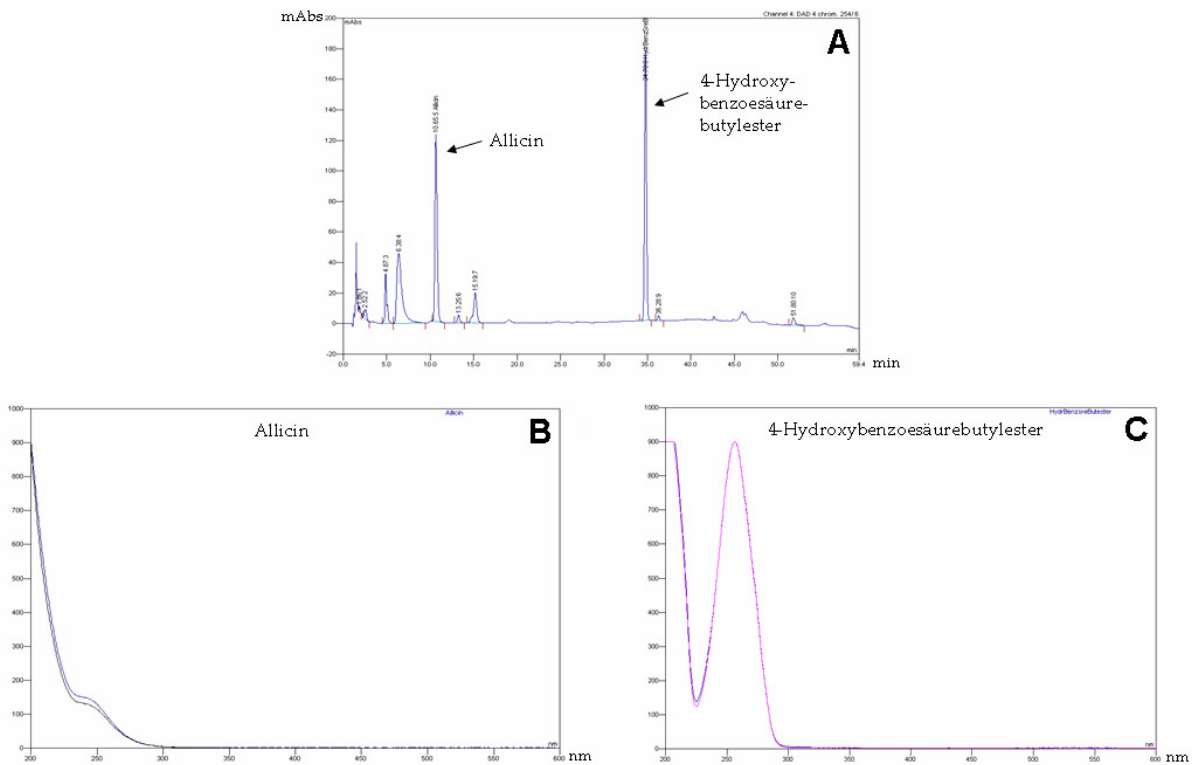


Abb. 14: Diagramme der HPLC-Analyse von Knoblauchsafte

**A:** Typisches Chromatogramm von verdünntem und mit internem Standard versetztem Knoblauchsafte bei 254 nm (Gesamtverdünnungsfaktor 1:25); Peaks des Allicins und des internen Standards (4-Hydroxybenzoesäurebutylester) sind mit Pfeilen markiert; **B:** Spektrum des im Chromatogramm als Allicin bezeichneten Peaks (blaue Linie) im Vergleich zum Spektrum des Allicin-Standards (schwarze Linie); **C:** Spektrum des im Chromatogramm als 4-Hydroxybenzoesäurebutylester bezeichneten Peaks (blaue Linie) im Vergleich zum Spektrum des reinen 4-Hydroxybenzoesäurebutylester-Standards (rosa Linie)

#### 4.1.2 Kalibration des Bioassays anhand von HPLC-Daten

Zu Beginn der Untersuchung des möglichen Einsatzes von Knoblauchsafte zur Reduktion der Infektion von Tomatenpflanzen mit *Phytophthora infestans* wurde die Wirksamkeit des verwendeten Knoblauchsafte durch die gleichzeitige Durchführung eines Bioassays, wie er unter 3.2.1 beschrieben ist, getestet. Um nun den Allicingehalt der Knoblauchsäfte abschätzen zu können, die vor der Etablierung der HPLC-Methode in den Pathogen-Versuchen eingesetzt worden waren, wurde der erwähnte Bioassay mit Hilfe der HPLC-Daten kalibriert. Hierzu

wurden 0, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% Knoblauchsafte im Bioassay getestet und der Allicin-Gehalt desselben Saftes mittels HPLC bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Hemmhofdurchmesser mit steigender Allicin-Konzentration zunahm. In Abbildung 15 sind die Logarithmen der Hemmhofdurchmesser der verschiedenen Knoblauchsafte, die im Bioassay ermittelt wurden, gegen die entsprechende Allicin-Konzentration, die mittels HPLC gemessen worden war, in  $\text{mg ml}^{-1}$  aufgetragen.

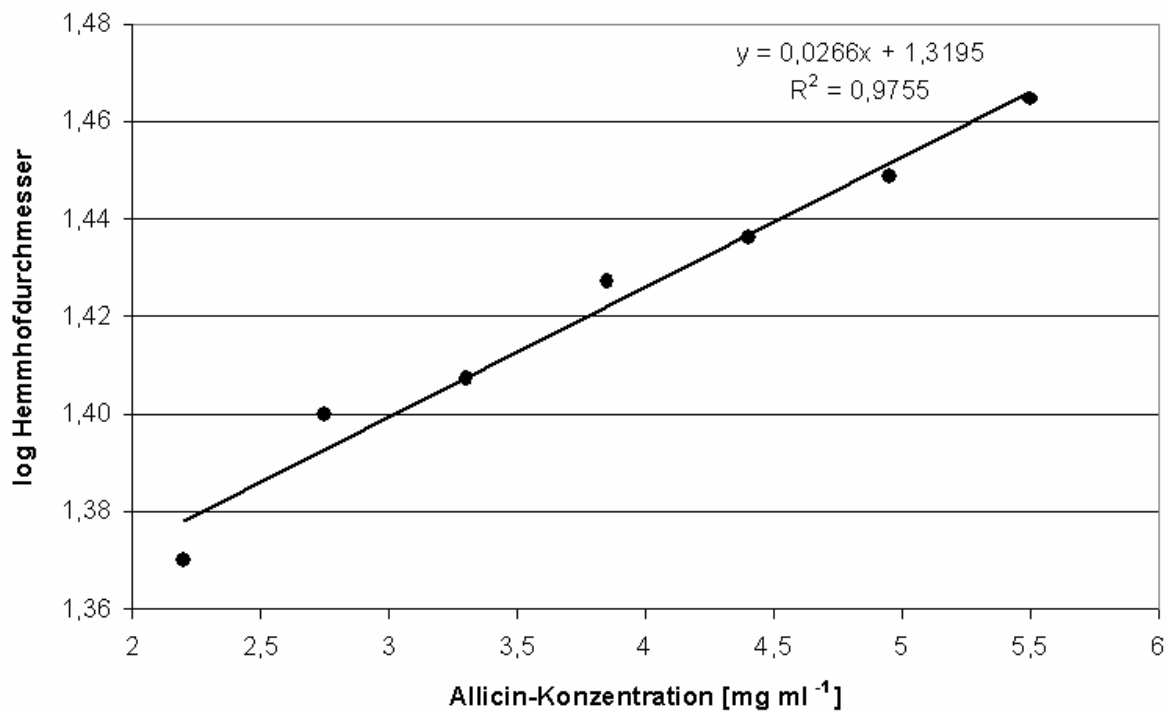


Abb. 15: Kalibrations des Bioassays anhand von HPLC-Daten

Es konnte eine lineare Korrelation zwischen den logarithmierten Hemmhofdurchmessern und der Allicin-Konzentration festgestellt werden. Mit Hilfe der ermittelten Geradengleichung war es möglich den Allicin-Gehalt der in den ersten Pathogen-Versuchen verwendeten Knoblauchsäfte im Nachhinein zu berechnen.

## 4.2 Vergleich der Wirksamkeit von in Knoblauchsafte enthaltenem und reinem Allicin im Bioassay

Um zu untersuchen, ob die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs tatsächlich auf das Allicin zurückzuführen ist, wurde der *E. coli*-Bioassay mit reinem Allicin (in 60% Methanol + 0,1% Ameisensäure; Axxora GmbH) durchgeführt. Nach HPLC-Analyse wies der eingesetzte Standard eine Konzentration von  $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$  Allicin auf. Der durchgeführte Bioassay (vgl.

3.2.1) ergab einen durchschnittlichen Hemmhofdurchmesser von 22,75 mm. Dies entspricht einem Logarithmus von 1,36. Setzt man diesen Wert in die unter 4.1.2 erwähnte Kalibrationsgleichung ein und löst diese nach „x“ auf, so erhält man eine Konzentration von  $1,52 \text{ mg ml}^{-1}$  Allicin. Der Bioassay ergab also lediglich  $0,08 \text{ mg ml}^{-1}$  Allicin weniger als mit der HPLC detektiert wurde. So liegt der Unterschied zwischen Bioassay und HPLC bei nur 5%.

### **4.3 Untersuchungen zum Wirkpotential von Knoblauchsft gegen phytopathogene Organismen**

Besonders im ökologischen Landbau ist das Interesse an natürlichen Wirkstoffen gegen phytopathogene Organismen groß, da in diesem Bereich der Pflanzenproduktion der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln untersagt ist. *In vitro* konnten CURTIS *et al.* (2004) eine Wirksamkeit von Knoblauchsft gegen verschiedene Erreger von Pflanzenkrankheiten zeigen. In der vorliegenden Arbeit sollte das Wirkpotential des Knoblauchs gegen verschiedene Phytopathogene, darunter sowohl Blattpathogene als auch Erreger samenbürtiger Krankheiten, *in vivo* bzw. *in planta* geprüft werden. Die Versuche sollten eine Einschätzung der Nutzbarkeit des Knoblauchs im Pflanzenschutz ermöglichen. Hierbei sollte auch die notwendige Konzentration des Allicins für die verschiedenen Behandlungsmethoden untersucht werden, da die antimikrobielle Wirkung auf diesen Inhaltsstoff zurückzuführen zu sein scheint (vgl. 4.2).

#### **4.3.1 Wirkung gegen *Phytophthora infestans* an Tomate in Klimakammer-Versuchen**

Mit *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel und der Braunfäule an Tomate, wurde für die Versuche zum Wirkpotential des Knoblauchs ein weitverbreitetes Pathogen gewählt. Die Infektion eines Kartoffel- oder Tomatenbestandes mit diesem Erreger kann große Schäden anrichten. Im schlimmsten Fall kommt es zum Ausfall einer kompletten Ernte. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sollen einer ersten Beurteilung des Einsatzes von Knoblauchsft gegen den genannten Krankheitserreger dienen.

Sämtliche Versuche wurden mindestens in dreifacher Wiederholung durchgeführt, um zufällige Unterschiede zwischen den Varianten ausschließen zu können. Die in den folgenden Abschnitten gezeigten Diagramme stellen die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments der jeweiligen Versuchsreihe dar. Die Abbildungen zeigen den Wirkungsgrad der einzelnen Varianten nach

ABBOTT (1925) berechnet. Bei dieser Darstellungsart werden die Rohdaten der Versuche, also die Befallsraten, nach der folgenden Formel mit den Daten der Kontrollvariante verrechnet.

$$\% \text{ Wirkung} = \frac{\text{befallene Blattfläche d. Kontrolle} - \text{befallene Blattfläche d. Behandlung}}{\text{befallene Blattfläche d. Kontrolle}} \times 100$$

Dies soll einerseits den Vergleich der einzelnen Varianten eines Experiments unter Einbezug der befallenen Blattfläche der Kontrolle erleichtern, andererseits aber auch den Vergleich verschiedener Versuche.

#### 4.3.1.1 Bestimmung einer wirksamen Verdünnung des Knoblauchsafte und der entsprechenden Allicin-Konzentration

Als Grundlage für Versuche, in denen die Wirkung von Knoblauchsaft gegen *Phytophthora infestans* unter verschiedenen Gesichtspunkten geprüft werden sollte, musste zunächst eine wirksame Verdünnung des Saftes gefunden und die entsprechende Allicin-Konzentration bestimmt werden. Hierzu wurden Tomatenpflanzen vor der Inokulation mit *P. infestans* mit verschiedenen Verdünnungen frischen Knoblauchsafte besprüht und nach vier Tagen Inkubation die befallene Blattfläche bonitiert (vgl. 3.5.1.1). Nach der Verrechnung der Daten mit Hilfe der oben genannten Gleichung konnte das folgende Diagramm erstellt werden (Abb. 16). Dabei sind Varianten, die sich signifikant voneinander unterscheiden durch unterschiedliche Buchstaben markiert.

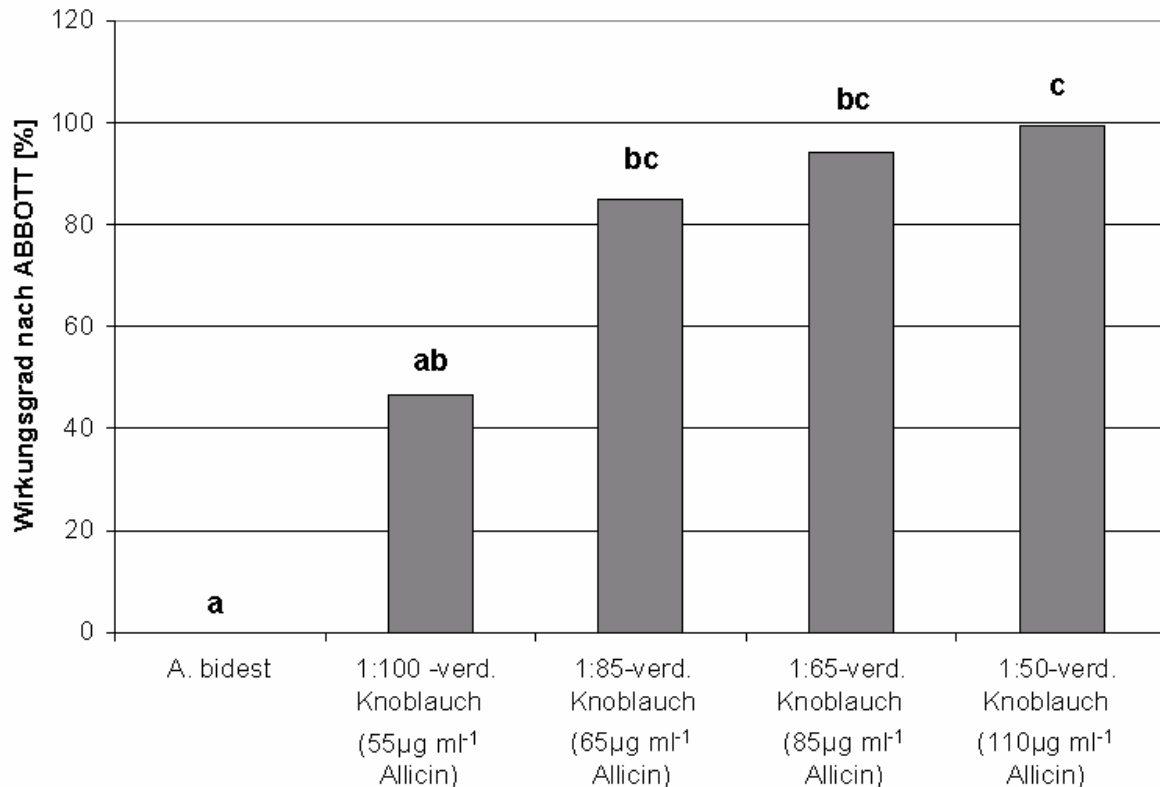


Abb. 16: Wirkung von verschiedenen Knoblauchsftverdünnungen gegen *Phytophthora infestans* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 77%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Dunn´s Test,  $p \leq 0,05$ ).

Im Vergleich zur Wasser-Kontrolle zeigten alle eingesetzten Verdünnungen des Knoblauchsftes eine Wirksamkeit gegen den Erreger. Schon mit einer 100-fachen Verdünnung, was etwa  $55 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin entsprach, konnte eine Wirkung von 50% erreicht werden, d.h. die befallene Blattfläche konnte um die Hälfte reduziert werden. Der Unterschied zur Wasser-Kontrolle konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden. Wurde der Saft 1:50-verdünnt eingesetzt, verwendete man also eine Konzentration von etwa  $110 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin, so betrug die Wirksamkeit fast 100% und war signifikant unterschiedlich zur Wasser-Kontrolle.

#### 4.3.1.2 Einfluss verschiedener Behandlungsmethoden auf die Wirksamkeit des Knoblauchsftes

Da im Pflanzenschutz neben der Sprühapplikation von Fungiziden auch eine Gießapplikation nicht unüblich ist, sollte die Verwendbarkeit dieser Applikationstechnik auch für Knoblauchsft

untersucht werden. Bei Allicin, dem vermuteten Wirkstoff des Knoblauchs, handelt es sich um eine stark flüchtige Verbindung. Deshalb könnte sich das Gießen der Pflanzen gegenüber dem Sprühen als vorteilhaft erweisen, weil dabei der Saft nicht so fein verteilt würde, und so das Allicin nicht schon während der Behandlung verdunsten könnte. Ein Nachteil könnte jedoch darin bestehen, dass der Erreger keinen direkten Kontakt zum Wirkstoff hat, solange dieser nicht von der Pflanze aufgenommen und von den oberen Pflanzenteilen wieder freigesetzt wird oder die Wirkung über die Gasphase eintritt. Des Weiteren sollten die Ergebnisse Aufschluss darüber geben, ob das Allicin eine systemische Wirkung aufweist.

Für diese Versuchsreihe wurden Tomatenpflanzen sowohl mit verschiedenen Knoblauchsaftkonzentrationen gegossen (5 ml pro Pflanze) als auch besprüht. Um den verminderten Kontakt des Pathogens mit dem Wirkstoff möglicherweise ausgleichen zu können, wurden für die Gießapplikation höhere Konzentrationen gewählt. Nach dem Abtrocknen der Spritzbrühe wurden die Pflanzen mit einer Sporensuspension von *P. infestans* inokuliert (vgl. 3.5.1.1). Nach einer viertägigen Inkubation wurde die befallene Blattfläche geschätzt und die gewonnenen Daten nach ABBOTT (1925) verrechnet. Das folgende Diagramm (Abb. 17) stellt die Wirkung der verschiedenen Behandlungsmethoden dar.

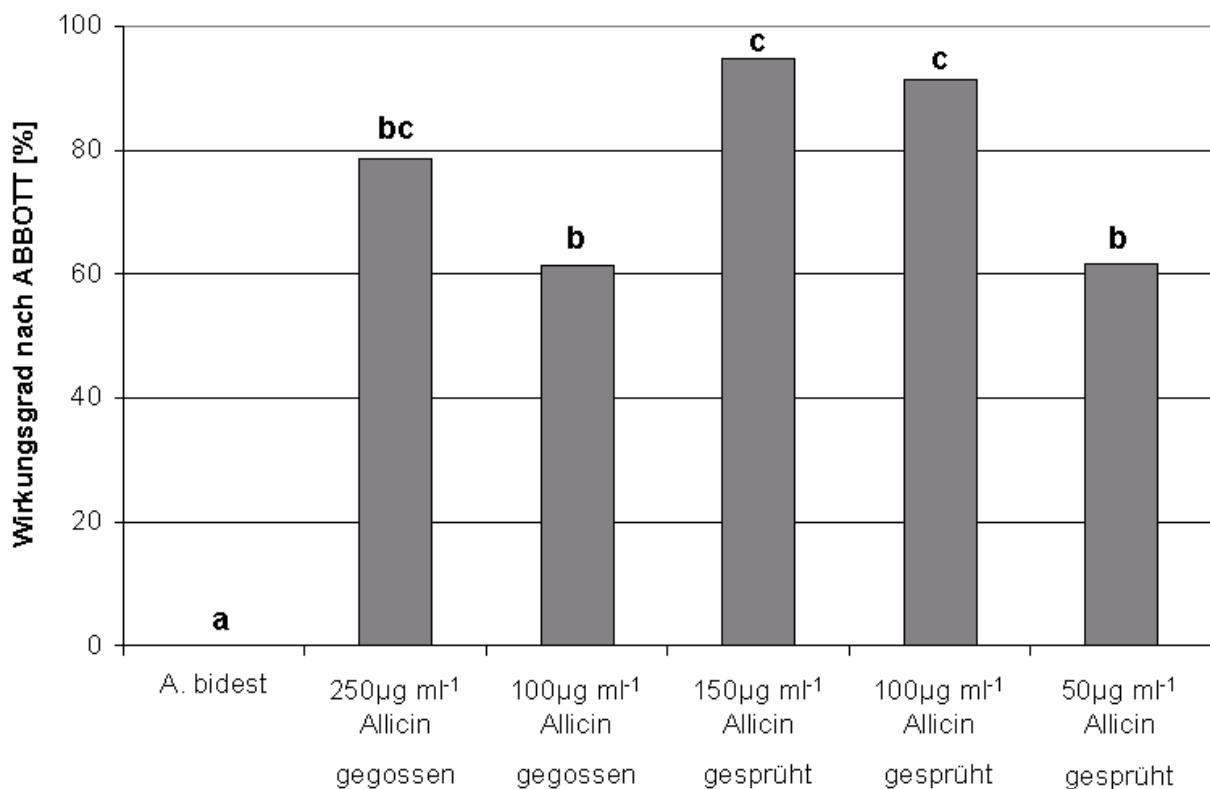


Abb. 17: Wirkung verschiedener Behandlungsmethoden mit Knoblauchsafte gegen *Phytophthora infestans* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 41%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Sowohl durch Besprühen der Blätter mit einer Allicin-Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  als auch durch Gießen mit einer doppelt so hohen Konzentration konnte eine gut 60%-ige Wirksamkeit des Knoblauchsafte gegen eine *P. infestans*-Infektion der Tomatenpflanzen erreicht werden. Eine Erhöhung der verwendeten Konzentration um  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin führte bei der Sprühbehandlung zu einer deutlichen Steigerung der Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu konnte selbst eine Allicin-Konzentration von  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  die Wirkung des Knoblauchs bei der Gießapplikation nicht signifikant verbessern. Die statistische Verrechnung der Daten zeigte bei allen Varianten einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle, die eine befallene Blattfläche von durchschnittlich 41% aufwies.

#### 4.3.1.3 Einfluss verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Wirksamkeit des Knoblauchsafte

Abbildung 18 stellt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs zur Untersuchung des Einflusses des Zeitpunktes der Behandlung auf die Wirkung des Knoblauchsafte dar. Dazu wurden Tomatenpflanzen 0, 1 und 2 Tage vor und 1 Tag nach der Inokulation mit *P. infestans* mit verdünntem Knoblauchsafte ( $70 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) besprüht. Die Bonitur der befallenen Blattfläche erfolgte wiederum nach vier Tagen.

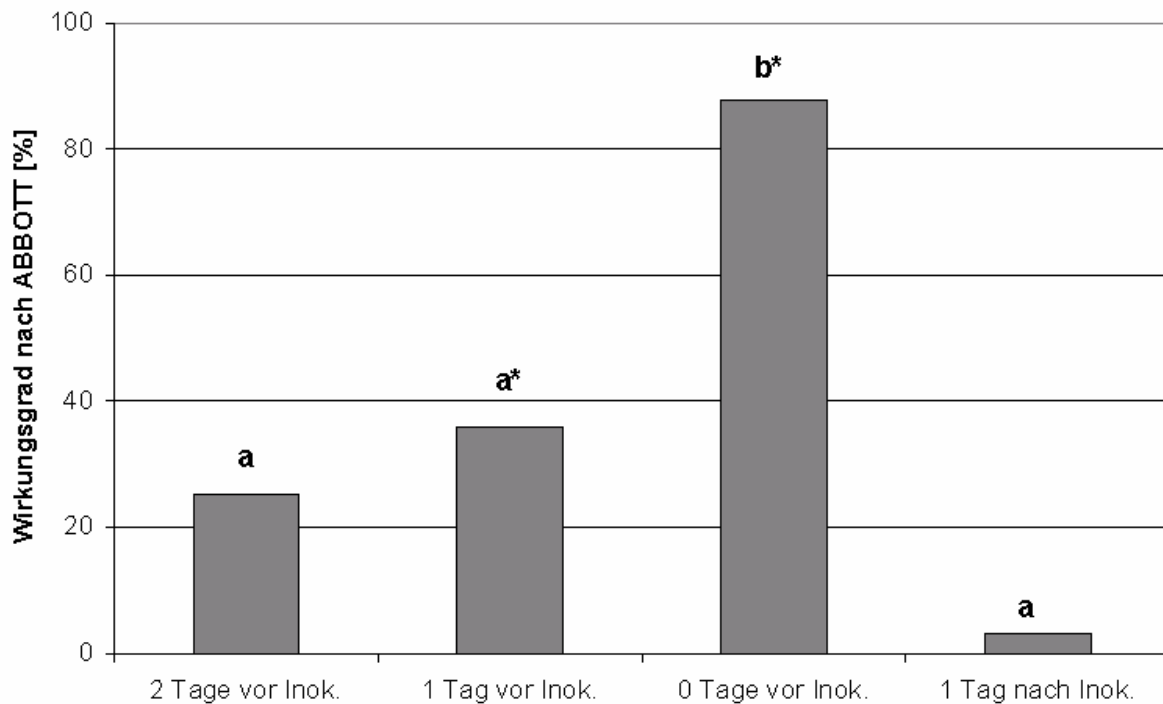


Abb. 18: Einfluss verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Wirksamkeit von Knoblauchsafft ( $70 \mu\text{g ml}^{-1}$  Alliin) gegen *Phytophthora infestans* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von Abbott (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 55%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ). Ein Stern (\*) hinter den Buchstaben steht für einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle.

Zwischen den Behandlungen, die an den Tagen vor bzw. nach der Inokulation durchgeführt wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Wirksamkeit des Knoblauchsafftes festgestellt werden. In allen drei Varianten lag die Wirkung unter 40%. Im Vergleich zur Wasser-Kontrolle zeigte lediglich eine Behandlung einen Tag vor der Inokulation eine signifikante Reduktion der befallenen Blattfläche, die in der Kontrolle bei durchschnittlich 55% lag. Eine Applikation des Saftes am Tag der Inokulation konnte die Infektion der Tomatenpflanzen mit *Phytophthora infestans* deutlich stärker reduzieren, so dass eine Wirksamkeit von über 80% erreicht werden konnte. Dies stellt eine signifikante Reduktion des Befalls verglichen mit der Wasser-Kontrolle dar.

#### 4.3.1.4 Untersuchungen zur Veränderung der Wirksamkeit des Knoblauchsafftes zu verschiedenen Boniturzeitpunkten

Für einen möglichen Einsatz des Knoblauchsafftes im Pflanzenschutz ist auch wichtig, wie lange die Infektion der Pflanze durch eine einmalige Behandlung mit Knoblauchsafft unterdrückt

werden kann. Nimmt die Wirksamkeit einer Substanz zu schnell ab, kann sie in der landwirtschaftlichen Praxis nicht ökonomisch sinnvoll eingesetzt werden, da zu häufige Folgebehandlungen notwendig wären.

Nach dem Besprühen der Tomatenpflanzen mit verdünntem Knoblauchsaff, der Allicin in einer Konzentration von  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  beinhaltet, und der anschließenden Inokulation mit einer *P. infestans*-Sporensuspension wurde die befallene Blattfläche der Pflanzen nach vier, sieben und zehn Tagen Inkubation bonitiert. Die Verrechnung der Daten erfolgte auch diesmal nach der Methode von ABBOTT (1925). Abbildung 19 zeigt das typische Ergebnis eines Experiments dieser Versuchsreihe.

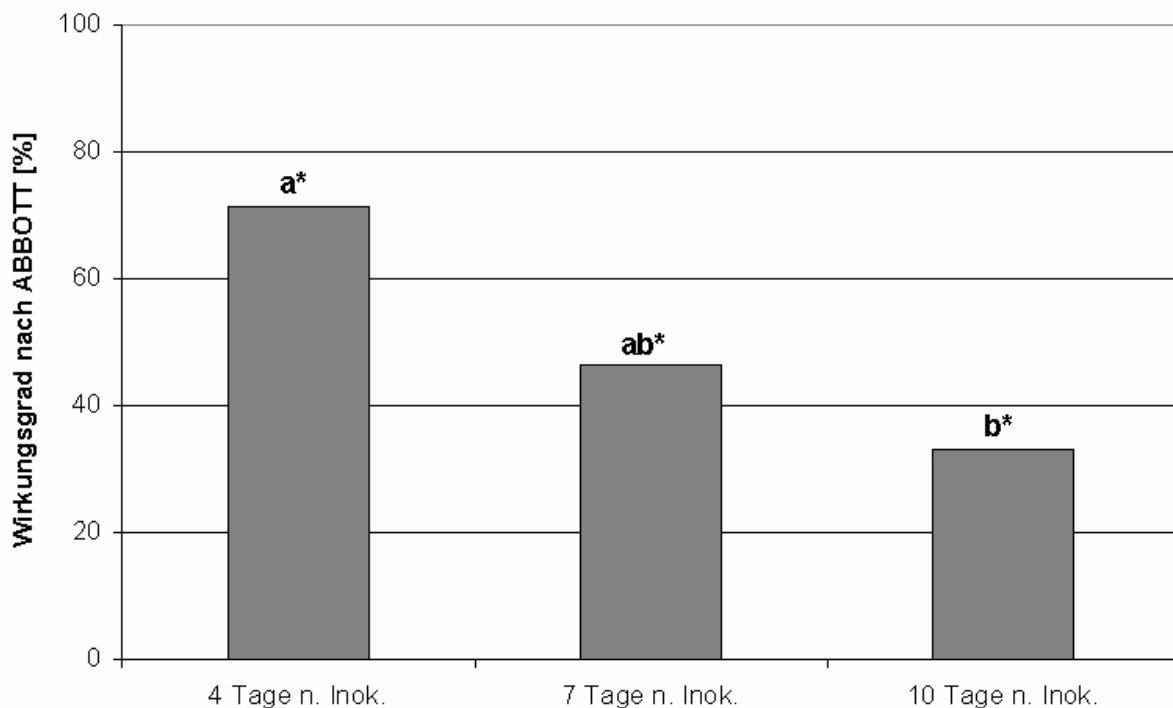


Abb. 19: Änderung der Wirksamkeit von Knoblauchsaff ( $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) gegen *Phytophthora infestans* an Tomate im Verlauf von 10 Tagen

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag zwischen 60% und 63%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ). Ein Stern (\*) hinter den Buchstaben steht für einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle.

Die Behandlung zeigte zum üblichen Boniturzeitpunkt nach vier Tagen eine Wirkung von etwa 70%. Drei Tage später war noch keine signifikante Reduktion der Wirksamkeit des Knoblauchsaffes zu erkennen. Am zehnten Tag nach der Inokulation mit *Phytophthora infestans*

konnte jedoch nur mehr eine halb so starke Wirkung verzeichnet werden. Die Wirksamkeit des Saftes war auf 35% gesunken und wich signifikant von der Wirkung am vierten Tag nach der Inokulation ab. Zu allen Boniturzeitpunkten konnte im Vergleich zur Wasser-Kontrolle, mit einer durchschnittlichen befallenen Blattfläche von 60% bis 63%, eine signifikante Reduktion des Befalls erreicht werden.

#### 4.3.1.5 Einfluss der Größe des umgebenden Raumes auf die Wirksamkeit des Knoblauchsaftes

Bei Allicin, auf das wahrscheinlich der Hauptteil der Wirkung des Knoblauchs zurückzuführen ist (s.a. 4.2), handelt es sich, wie bereits erwähnt (siehe 1.1 und 4.3.1.2), um eine stark flüchtige Substanz. Die Pflanzen wurden in den Versuchen mit *P. infestans* zur Verbesserung der Infektionsbedingungen unter Hauben gehalten. Es kann vermutet werden, dass dadurch auch die Verflüchtigung des Allicins reduziert wurde. Dies führte zu der Überlegung, dass die Wirksamkeit abnehmen könnte, wenn die Größe des umgebenden Raums erhöht wird. Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Hauben lediglich für 24 h nach der Inokulation über den Pflanzen blieben, um die für eine Infektion notwendige hohe Luftfeuchtigkeit zu erhalten. Anschließend wurden die Hauben entfernt, so dass der die Pflanzen umgebende Raum auf die Gesamtgröße der Klimakammer erhöht wurde. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind im folgenden Diagramm dargestellt (Abb. 20).

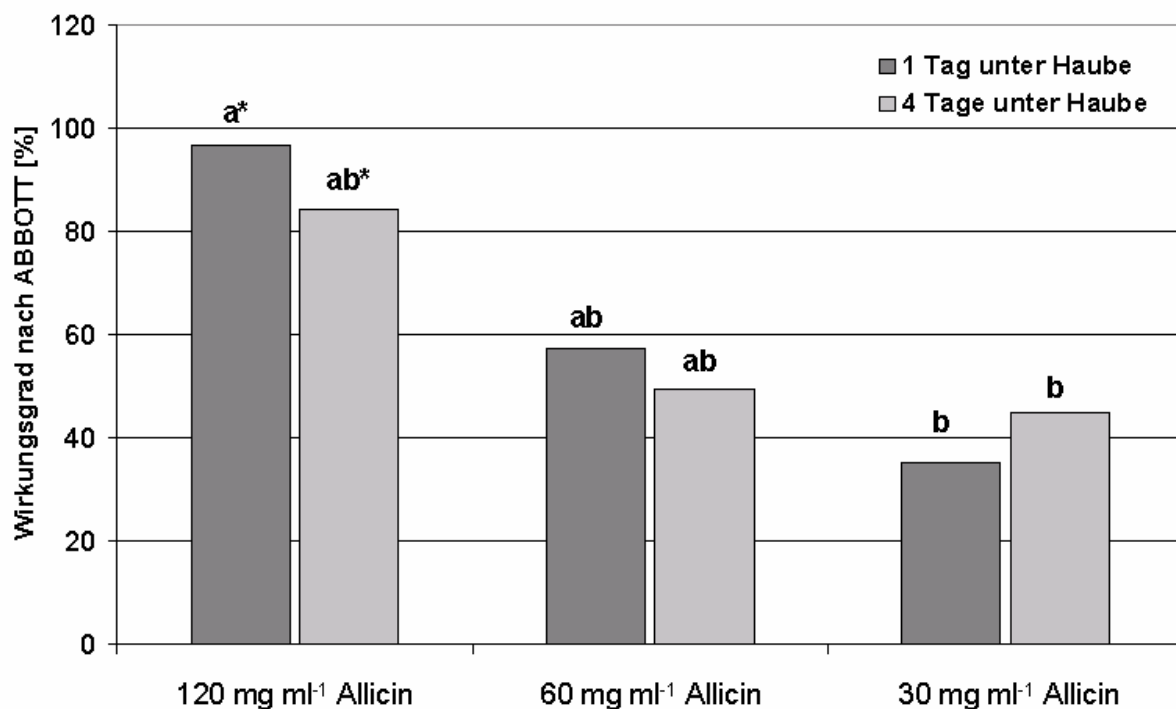


Abb. 20: Einfluss der Größe des umgebenden Raumes auf die Wirksamkeit von Knoblauchsajt gegen *Phytophthora infestans* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 36%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ). Ein Stern (\*) hinter den Buchstaben steht für einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle.

Die geringste der eingesetzten Knoblauchsaff-Verdünnungen, die einer Allicin-Konzentration von etwa  $120 \mu\text{g ml}^{-1}$  entsprach, erreichte eine Wirksamkeit von mehr als 80%, unabhängig von der Dauer, die die Hauben über den Pflanzen belassen wurden. Mit sinkender Konzentration nahm auch die Wirkung gegen das Pathogen ab. Lediglich mit der höchsten Allicin-Konzentration konnte eine signifikante Reduktion der befallenen Blattfläche im Vergleich zur Wasser-Kontrolle erzielt werden konnte. Ein signifikanter Unterschied der Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Raumgröße konnte nicht festgestellt werden.

#### 4.3.1.6 Untersuchungen zur Phytotoxizität des Knoblauchsaffes

Ein weiteres Ausschlusskriterium für ein Pflanzenschutzmittel ist eine pflanzenschädigende Wirkung. Zur Bewertung der Phytotoxizität eines Wirkstoffs wurde der unter 3.6 gezeigte, international gültige Bewertungsschlüssel verwendet (GOROG NEE PRIVITZER *et al.*, 1988). Zeigen behandelte Pflanzen im Test Schäden, welche auf die eingesetzte Substanz zurückzuführen sind, werden diese den aufgelisteten Schadensklassen zugeordnet. Kommen mehrfach Schäden der Klasse 3 und höher vor, kann die entsprechende Substanz im Pflanzenschutz nicht eingesetzt werden. Die Pflanzen dürfen also maximal 2,5% nekrotisierte Blattfläche im Verhältnis zur gesamten Blattfläche aufweisen.

Um eine mögliche phytotoxische Wirkung des Knoblauchs zu untersuchen, wurden Versuche wie in Kapitel 3.6 beschrieben durchgeführt. Da zu vermuten war, dass im Freiland eine höhere Allicin-Konzentration eingesetzt werden würde, wurden in den Tests Konzentrationen von 200 bis  $800 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin verwendet, was deutlich über den Werten der Klimakammer-Versuche lag. Die Auswertung fand vier Tage nach der Behandlung statt. In Tabelle 9 sind die durchschnittlichen Ergebnisse der Phytotoxizitätsbewertungen aus drei Versuchen zusammengefasst.

Allicin-Konzentration im verwendeten Knoblauchsft [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]	Phytotoxizität-Klasse
0	1
200	1
400	1
800	2

Tab. 9: Bewertung der pflanzenschädigenden Wirkung von Knoblauchsft

Getestet wurden vier verschiedene Knoblauchsft-Konzentrationen an 3 Wochen alten Tomatenpflanzen (3 Wiederholungen). Die Bonitur erfolgte 4 Tage nach Behandlung (Bewertungsschlüssel siehe Kapitel 3.6). Einstufungen bis zu Klasse 2 sind unbedenklich (STIEGER, pers. Mitteilung).

Wie in Tabelle 9 zu sehen, zeigte lediglich die höchste Konzentration ( $800 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) eine leichte phytotoxische Wirkung. Jedoch lag die geschädigte Blattfläche bezogen auf die Gesamtblattfläche der Pflanze nicht über 2,5%.

#### 4.3.1.7 Versuche zur Formulierung von frischem Knoblauchsft

Für die Verlängerung der Wirkdauer des Knoblauchsftes könnte eine Formulierung hilfreich sein. Damit diese gegebenenfalls auch im ökologischen Landbau genutzt werden kann, sollte sie aus einer biologischen Basis bestehen. In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Patel von der FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft) in Braunschweig wurden verschiedene Verkapselungen des frischen Knoblauchsftes getestet. Unter anderem wurde der Saft in eine Alginat-Kapsel eingeschlossen. Auf diese Weise sollte die Verdunstung des Allicins reduziert und die Verweildauer an der Pflanze erhöht werden. Darüber hinaus wäre es möglich, dass der Wirkstoff nach und nach abgegeben würde, und so länger für die Inhibition der *P. infestans*-Infektion zur Verfügung stünde. Außerdem konnte durch diese Formulierungsmethode eine weitere Applikationstechnik getestet werden. Die Kapseln wurden direkt auf die Erde unter den Pflanzen ausgebracht. Parallel wurde eine Variante wie gewohnt mit verdünntem Knoblauchsft ( $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) besprüht. Nach dem Abtrocknen des Spritzbelags in der Kontroll-Variante wurden die Pflanzen mit *P. infestans* inokuliert, wie unter 3.5.1.1 beschrieben inkubiert und nach vier Tagen bonitiert. Die nach ABBOTT (1925) verrechneten Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

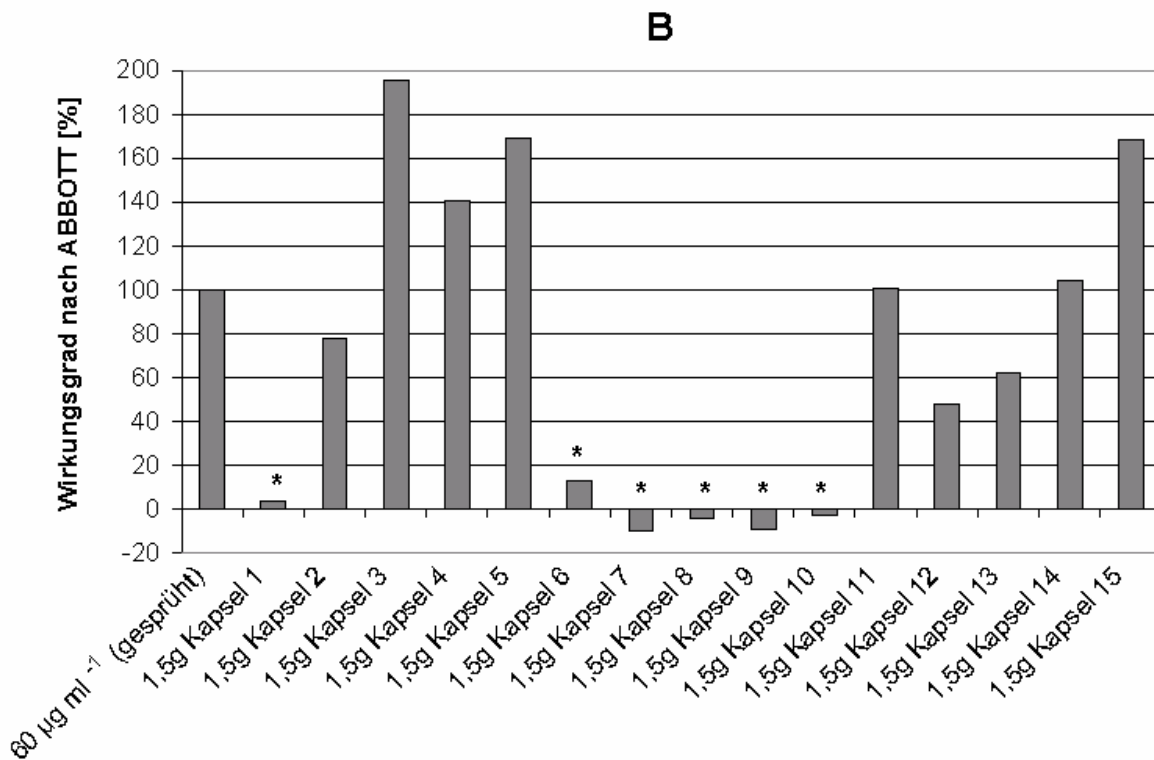
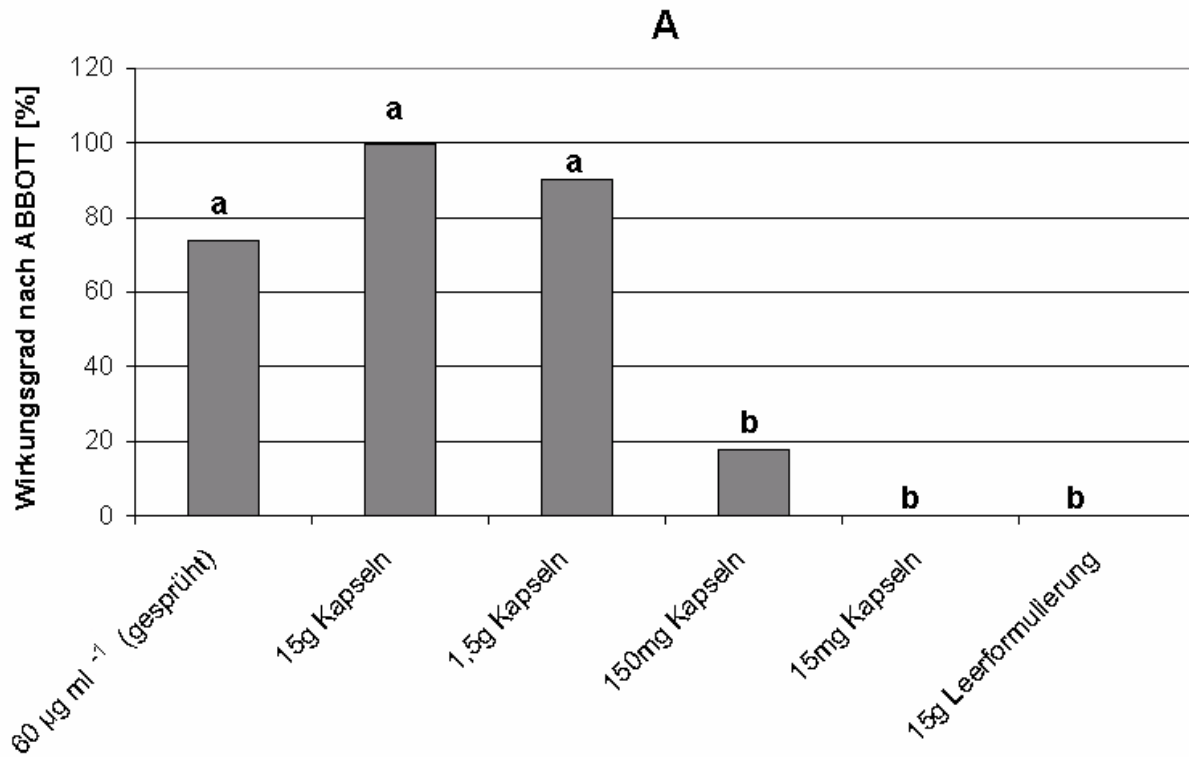


Abb. 21: Wirkung von verkapseltem Knoblauchsafft gegen *Phytophthora infestans* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

A: Alginat-Kapsel mit frischem Knoblauch in verschiedenen Mengen ausgebracht. Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der mit der Leerformulierung behandelten

Kontrolle lag bei 60%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ). **B:** Einfluss verschiedener Kapselzusammensetzungen auf die Wirkung des frischen Knoblauchsafte gegen *P. infestans* an Tomate (Kapsel 4 entspricht der Kapsel aus Abb. 21A); Es wurden jeweils 1,5 g Kapseln ausgebracht. Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 53%. Die Wirkung des gesprühten Knoblauchs wich signifikant von der Wasser-Kontrolle ab (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ). Sie wurde gleich 100% gesetzt und die Werte der anderen Varianten entsprechend umgerechnet. Varianten, die sich signifikant von der Kontrolle (gesprühter Knoblauchsafft;  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) unterscheiden sind durch Sterne (\*) gekennzeichnet (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ).

In Diagramm 21 A sind die Ergebnisse eines Versuchs mit verschiedenen Mengen von Alginat-Kapseln dargestellt. Weder bei einer Anwendung von 15 g noch bei 1,5 g des mit Alginat verkapselten Knoblauchsafte war ein signifikanter Unterschied zur Wirkung einer gesprühten Knoblauchsafftverdünnung festzustellen. Alle drei Varianten erreichten eine Wirksamkeit von mehr als 70% und wichen damit signifikant von der Wasser-Kontrolle ab. Setzte man jedoch nur 150 mg der Kapseln ein, so konnten lediglich 20% Wirkung erzielt werden. In diesem Fall war der Unterschied zur Wasser-Kontrolle nicht statistisch absicherbar. Eine noch geringere Menge der Knoblauchkapseln zeigte, wie auch die Leerformulierung, keinerlei Effekt auf die Infektion von Tomatenpflanzen mit *Phytophthora infestans*. In Diagramm 21 B ist der Einfluss verschiedener Kapselzusammensetzungen auf die Wirkung des Knoblauchsafte gegen *P. infestans* an Tomate dargestellt. Kapseln 1 und 6 bis 10 zeigten eine signifikant schlechtere Wirksamkeit als der gesprühte Knoblauchsafft. Zwar zeigten einige der anderen Kapseln eine erhöhte Inhibition der *P. infestans*-Infektion, jedoch erwiesen sich diese Unterschiede zum gesprühten Knoblauch als nicht-signifikant.

#### 4.3.2 Untersuchung der Wirkung von Knoblauch gegen *Phytophthora infestans* im Freiland

Außer der Braunfäule an Tomate verursacht *Phytophthora infestans* auch die Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel. Um das Wirkpotential des Pflanzensaftes gegen *P. infestans* an Kartoffel im Freiland zu testen, wurde ein Versuch wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben angelegt. Da angenommen werden konnte, dass Umweltfaktoren, wie Regen, Sonne und Wind, die Wirksamkeit des Knoblauchsafte bzw. des Allicins negativ beeinflussen würden, wurde der Saft höher konzentriert als in Klimakammer-Versuchen eingesetzt ( $300$  und  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin). Die Behandlung erfolgte zu praxisüblichen Terminen und wurde sechsmal wiederholt. Zur Bonitur der Befallsstärke wurde der prozentuale Anteil der nekrotisierten Blattfläche im Verhältnis zur

gesamten Blattfläche geschätzt. In Abb. 22 A-D sind Beispiele der verwendeten Boniturstufen abgebildet, wobei die angegebenen Zahlen den geschätzten nekrotisierten Blattflächen entsprechen.



Abb. 22: Boniturstufen des Freilandversuchs

**A:** Boniturstufe 0; **B:** Boniturstufe 2; **C:** Boniturstufe 5; **D:** Boniturstufe 10

Abbildung 23 fasst die Ergebnisse der vier Wiederholungen des Versuchs zusammen. Dargestellt sind die Boniturdaten acht Wochen nach der ersten Behandlung.

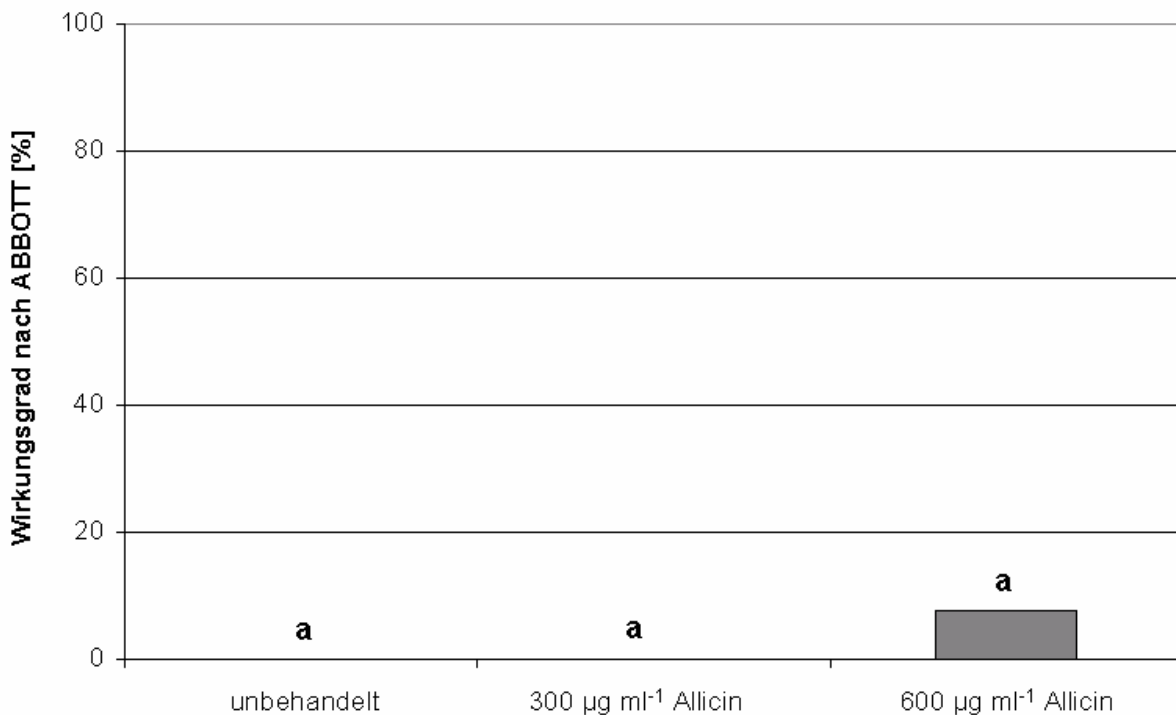


Abb. 23: Wirkung von Knoblauchsafte gegen *P. infestans* an Kartoffel im Freilandversuch (8 Wochen nach 1. Behandlung)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der unbehandelten Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 3%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Aufgrund der eher trockenen Witterung während der Versuchsphase lag der Befallsgrad der Kartoffelpflanzen auch in der unbehandelten Kontrolle unter 5%. Beide Knoblauchsafkonzentrationen zeigten eine Wirksamkeit von weniger als 10%. Ein signifikanter Unterschied konnte weder zwischen den eingesetzten Allicin-Konzentrationen noch zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Neben dem Befall wurden auch phytotoxische Effekte bonitiert. Es konnte jedoch in keiner der Varianten eine Phytotoxizität des Knoblauchsafes festgestellt werden.

#### 4.3.3 Wirkung gegen *Alternaria solani* an Tomate in Klimakammer-Versuchen

Neben *Phytophthora infestans* ist auch *Alternaria solani* ein weit verbreitetes Pathogen an Kartoffel und Tomate. Beide Erreger führen bei einer Infektion des Kartoffelkrautes zu ähnlichen Symptomen. Es konnte demnach nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Bonitur des Freilandversuchs (vgl. 4.3.2) auch eine *A. solani*-Infektion mit einbezogen wurde. Wäre dies der Fall, so könnte die beobachtete geringe Wirksamkeit des Knoblauchsafes auf eine niedrigere Empfindlichkeit von *Alternaria solani* gegenüber Knoblauch zurückzuführen sein. Aus diesem Grund sollte in Klimakammer-Versuchen mit dem Pathosystem *Alternaria solani* / *Solanum lycopersicum* (siehe 3.5.1.2) getestet werden, ob Knoblauchsaf ebenfalls eine Wirkung gegen diesen Pilz zeigt. Darüber hinaus sollte im Falle einer generellen Wirksamkeit eine zur Kontrolle des Pathogens nötige Allicin-Konzentration ermittelt werden. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs ist in Abbildung 24 zu sehen.

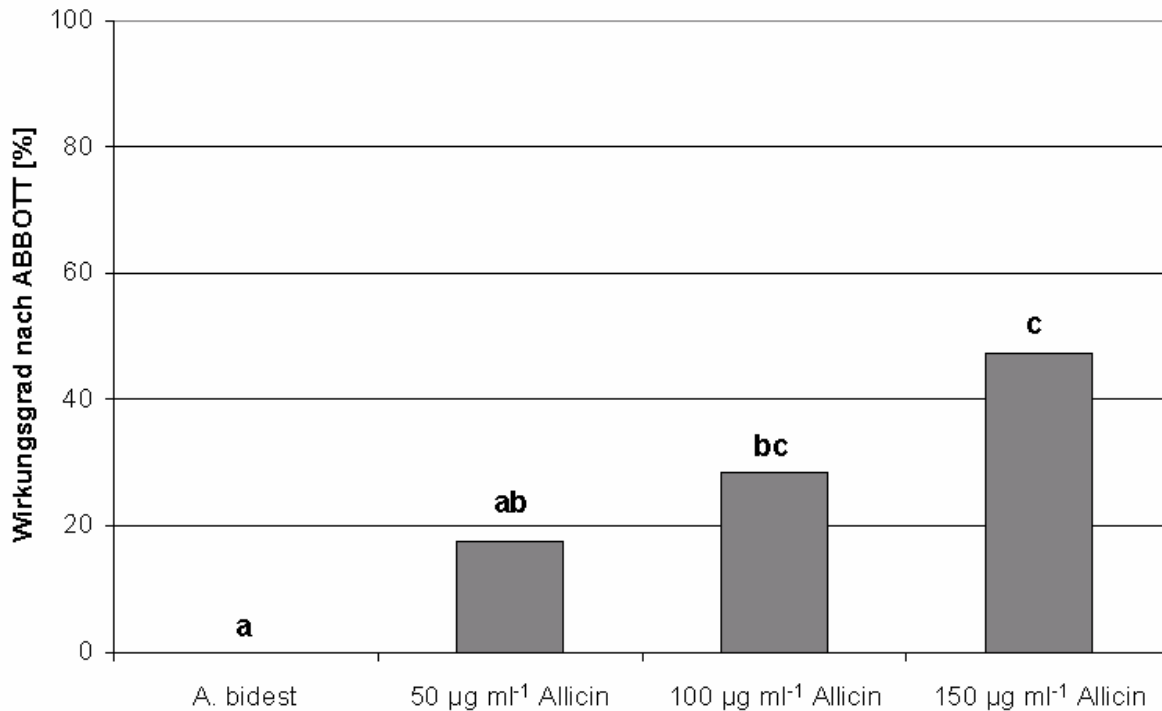


Abb. 24: Wirkung von Knoblauchsftverdünnungen mit verschiedenen Allicingehalten gegen *Alternaria solani* an Tomate (4 Tage nach Inokulation)

Zur Berechnung der Wirkung wurden die Boniturdaten der einzelnen Varianten mit denen der Wasser-Kontrolle nach der Methode von ABBOTT (1925) verrechnet und sind in % angegeben. Die durchschnittliche befallene Blattfläche in der Wasser-Kontrolle lag bei 80%. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten sind durch die Beschriftung der entsprechenden Säulen mit verschiedenen Buchstaben gekennzeichnet (Dunn´s Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Applikation einer Verdünnung des Knoblauchsftes mit einem Allicin-Gehalt von  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  führte zu einer Wirkung gegen *Alternaria solani* an Tomate von knapp 50%. Diese Wirkung wich signifikant von der Wirksamkeit der Wasser-Behandlung ab. Eine Behandlung mit einer Knoblauchsftverdünnung, die  $1/3$  des Allicin-Gehaltes, also  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin enthielt, zeigte eine Wirksamkeit, die unter 20% lag und sich nicht signifikant von der Wasser-Kontrolle unterschied. Durch den Einsatz der doppelten Allicin-Konzentration, konnte dieser Wert zwar lediglich um etwa 10% gesteigert werden, dies stellte jedoch einen signifikanten Unterschied zur Wasser-Kontrolle dar.

#### 4.3.4 Wirkung gegen *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina* an Karotte (*Daucus carota*)

Besonders im ökologischen Landbau stellen samenbürtige Krankheiten ein großes Problem dar. Aufgrund der gesetzlichen Einschränkungen ist dort eine Beizung des Saatgutes mit Fungiziden

und anderen chemischen Pflanzenschutzmitteln nur schwer möglich. Beizmittel, die für den ökologischen Landbau zugelassen sind, sind selten und weisen häufig eine deutlich geringere Wirksamkeit auf als chemische Mittel. Um zu untersuchen, ob eine Samenbehandlung mit Knoblauchsaff eine Wirkung gegen samenbürtige Krankheiten zeigt, sollten Versuche mit befallenen Karottensamen durchgeführt werden. Die Samen wurden über Herrn Dr. E. Koch (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Darmstadt) von Frau S. Werner (Hild Samen GmbH, Marbach) zur Verfügung gestellt und wiesen einen natürlichen Befall mit samenbürtigen Erregern auf. Mikroskopische Analysen des nach Inkubation auf Agar-Platten ausgewachsenen Myzels zeigten, dass es sich um einen Mischbefall mit *Alternaria dauci*, dem Erreger der Möhrenschrärze, und *Alternaria radicina*, dem Erreger der Schwarzfäule, handelte (siehe Abb. 25).

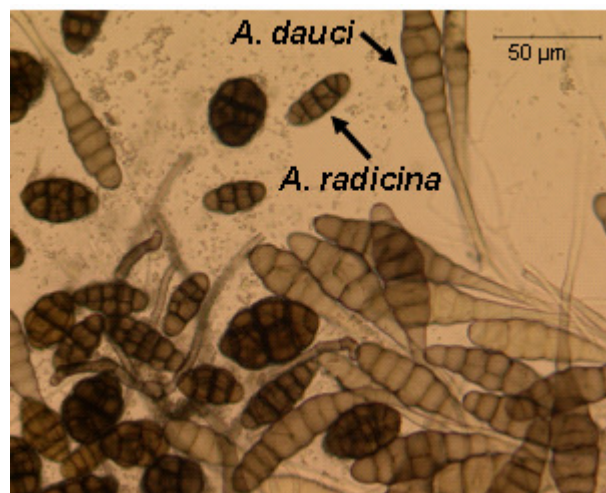


Abb. 25: Mikroskopische Aufnahme der Erreger, mit denen die für Versuche verwendeten Karottensamen befallen waren

Deutlich zu erkennen die verschiedenen Sporenformen von *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina*

Die Samen wurden, wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben, mit Knoblauchsaff behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente eine für den ökologischen Landbau zugelassene Trockenbeize (Aatiram®, 4 g kg<sup>-1</sup> Samen), die den Wirkstoff Thiram (Tetramethylthiuramdisulfid) beinhaltete. Die Wirkung wurde anhand der gesunden Keimlinge untersucht, d.h. die Anzahl der gekeimten Samen, bei denen die Keimlinge keinerlei Krankheitssymptome zeigten, wurde ermittelt und in Prozent angegeben. Die in den Diagrammen gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Wiederholungen der jeweiligen Versuchsreihe dar. Ausnahmen bilden Versuche, die lediglich einer groben Abschätzung einer nützlichen Allicin-Konzentration oder einem brauchbaren Testverfahren dienten. Diagramme zu diesen Versuchen zeigen Ergebnisse nur eines Tests.

#### 4.3.4.1 Bestimmung einer als Samenbehandlung wirksamen Knoblauchsft-verdünnung

Zunächst sollte untersucht werden, mit welcher Allicin-Konzentration im Knoblauchsft eine wirksame Samenbehandlung durchgeführt werden könnte, die keinen Schaden bei den Keimlingen hervorruft. So wurden die befallenen Samen eine Stunde in verschiedenen Verdünnungen des Knoblauchsftes inkubiert. Außerdem sollte getestet werden, welche Art der Behandlung von Vorteil ist. Hierzu wurden zusätzlich trockene oder zuvor eine Stunde in Wasser gequollene Samen für eine Stunde mit Allicin, welches aus dem Knoblauchsft entwich, begast. Die genaue Vorgehensweise wurde in Kapitel 3.5.3 beschrieben. Die Aussaat erfolgte in Erde.

In Abbildung 26 ist das Ergebnis dieses Vorversuchs dargestellt, wobei die Höhe der Säulen die gesunden Keimlinge drei Wochen nach der Behandlung in Prozent wiedergibt (n=100). Da es sich bei diesem Test um einen reinen „Screening“-Versuch zur Abschätzung eines wirksamen Konzentrationsbereichs des Allicins handelt, wurde er nur einmal durchgeführt. Aus diesem Grund lagen nicht ausreichend Daten vor, um eine statistische Analyse durchzuführen.

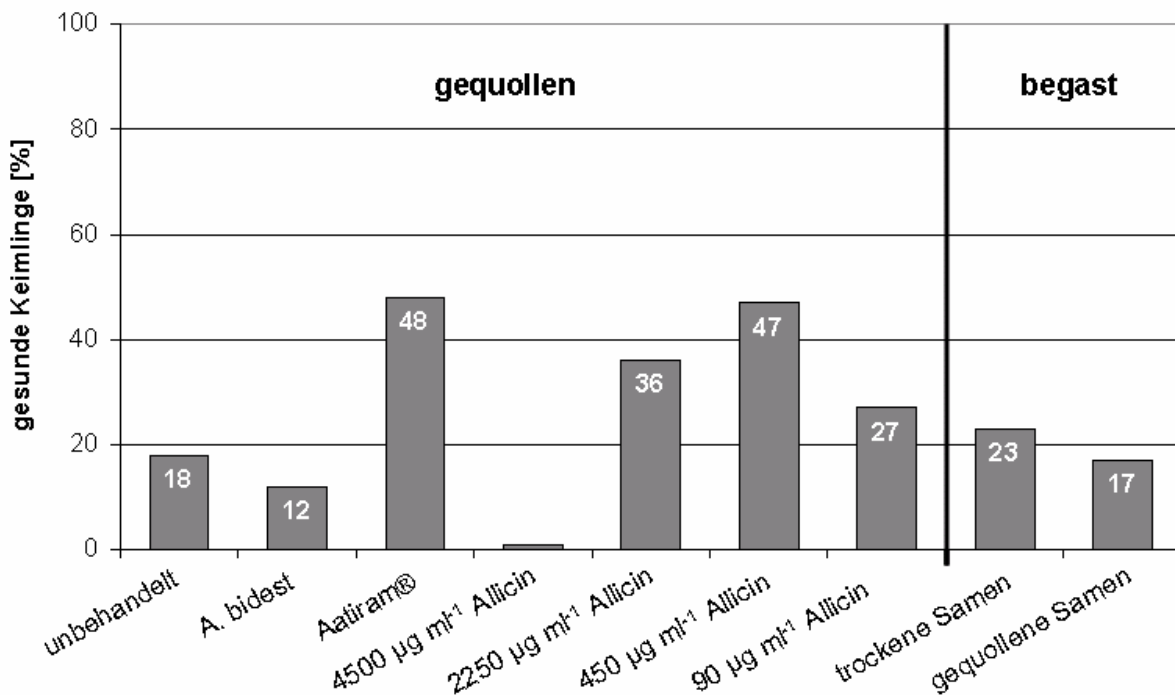


Abb. 26: Wirkung verschiedener Allicin-Konzentrationen und Behandlungsmethoden auf die Keimrate *Alternaria*-befallener Karottensamen

Als Positiv-Kontrolle diente eine handelsübliche Beize (Aatiram®, 4 g kg<sup>-1</sup> Samen).

Beschriftung der Säulen: Prozent gesunder Keimlinge drei Wochen nach der Behandlung (n=100)

Der Vergleich der beiden Behandlungsmethoden zeigte, dass durch Begasen der Samen die Zahl der gesunden Keimlinge weder bei trockenen noch bei feuchten Samen erhöht werden konnte. Beim Quellen der Samen in Knoblauchsaff bewirkte schon ein Allicingehalt von etwa  $90 \mu\text{g ml}^{-1}$  eine Verbesserung der Auflauftrate. Durch das Quellen der Samen in Knoblauchsaff mit einer Allicin-Konzentration von etwa  $450 \mu\text{g ml}^{-1}$  konnte eine Anzahl gesunder Keimlinge erreicht werden, die der entsprach, die nach der Beizung mit Aatiram® ermittelt werden konnte. In beiden Fällen brachten knapp 50% der Samen gesunde Keimlinge hervor. Eine zehnfach höhere Allicin-Konzentration wies phytotoxische Effekte auf, welche zu einer Reduktion der Auflauftrate um fast 100% führten.

#### 4.3.4.2 Vergleich verschiedener Testverfahren (Erde vs. Agar)

Nachdem ein wirksamer Bereich der Allicin-Konzentration ermittelt werden konnte, sollte getestet werden, ob eine Durchführung der Versuche auf Wasseragar-Platten möglich wäre, ohne die Ergebnisse zu verändern. Dies würde einen höheren Durchsatz an Versuchen ermöglichen, da weniger Platz während der Anzucht benötigt würde. Darüber hinaus könnte auch die Kultivierungsdauer herabgesetzt werden, da das Auszählen der Keimlinge schon in einem jüngeren Stadium möglich wäre. So wurden neun Varianten sowohl in Erde als auch auf Agar ausgesät und die Anzahl gesunder Keimlinge beim Versuch in Erde nach drei Wochen und beim Versuch auf Agar bereits nach zwei Wochen bestimmt. In Abbildung 27 ist der Vergleich der beiden Anzucht-Methoden dargestellt. Angegeben sind die Prozent gesunder Keimlinge ( $n=100$ ). Da es sich auch bei diesem Versuch um einen „Screening“-Versuch handelte, wurde er ebenfalls nur einmal durchgeführt. Aus diesem Grund lagen auch hier, wie schon bei Versuch 4.3.4.1, nicht genügend Daten vor, um eine statistische Analyse durchzuführen.

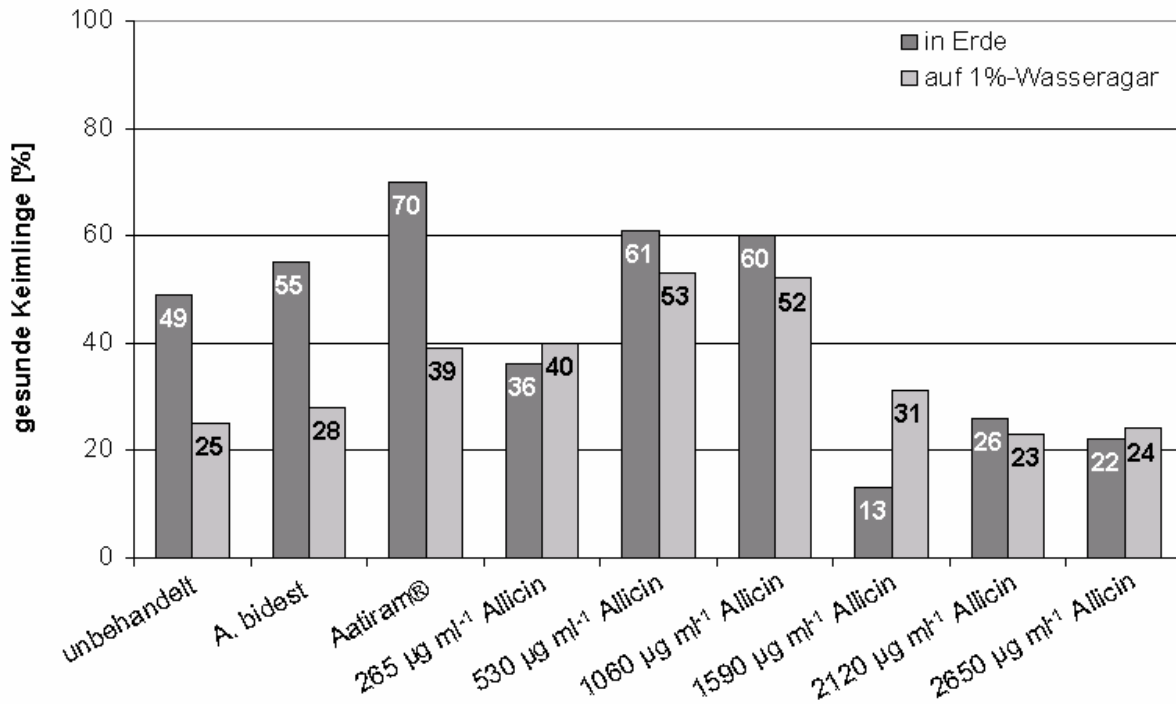


Abb. 27: Einfluss verschiedener Anzucht-Methoden auf die Keimrate behandelter und unbehandelter Karottensamen

Aatiram®-Behandlung: 4 g kg<sup>-1</sup> Samen; Beschriftung der Säulen: Prozent gesunder Keimlinge drei Wochen (Erde) bzw. 2 Wochen (Agar) nach der Behandlung (n=100)

Vergleicht man die Säulen der unbehandelten, Aatiram®-behandelten (4 g kg<sup>-1</sup> Samen) und Wasser-behandelten Varianten in Erde mit den Ergebnissen auf Agar, so stellt man fest, dass die Rate gesunder Keimlinge, die in Erde angezogen wurden, fast doppelt so hoch ist wie auf Agar. Ein solch extremer Unterschied war bei keiner der Knoblauch-Varianten zu erkennen. Hier lagen die Ergebnisse der beiden Anzucht-Methoden in den meisten Fällen weniger als 10% auseinander. Auch eine durchgehend höhere Keimrate der in Erde ausgebrachten Samen konnte bei diesen Varianten nicht beobachtet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen sowohl in Erde als auch auf Agar zu erkennen sind. Eine Behandlung mit einer Allicin-Konzentration zwischen 530 und 1060 µg ml<sup>-1</sup> führte bei beiden Anzucht-Verfahren zu einer Keimrate, die im Bereich derer lag, die mit einer Aatiram®-Behandlung erzielt werden konnte. In beiden Fällen konnten Behandlungen mit Knoblauchsaff dessen Allicingehalt bei 1590 µg ml<sup>-1</sup> oder darüber lag die Anzahl gesunder Keimlinge nicht steigern.

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurden die Karottensamen in allen im Folgenden beschriebenen Versuchen auf Wasseragar ausgesät.

#### 4.3.4.3 Untersuchungen zur Einbringung des Knoblauchs in ein praxisübliches „Seed-Priming“-Verfahren

Im Gemüsebau ist es üblich, Sämereien vor der Aussaat einem sogenannten „Seed-Priming“-Verfahren zu unterziehen. Bei dieser Methode, für die jede Saatgut-Firma ihr spezielles Protokoll entwickelt hat, werden die Samen für gewöhnlich in einem Osmotikum, wie Polyethylenglykol (PEG) gequollen und anschließend rückgetrocknet (BRADFORD, 1986). Dies soll die Keimung der Samen sowohl verbessern, als auch ihren Zeitpunkt innerhalb einer Saatgutcharge synchronisieren. Da in den Vorversuchen nach dem Quellen von *Alternaria*-befallenen Karottensamen in Knoblauchsaft-Verdünnungen ein verbessertes Auflaufen beobachtet werden konnte, sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, ob eine Einbindung der Knoblauch-Behandlung in ein „Seed-Priming“-Verfahren möglich ist. Die Durchführung dieser Tests wurde in Kapitel 3.5.3.1 beschrieben. In Abbildung 28 sind die durchschnittlichen Ergebnisse mehrerer Wiederholungen dieser Versuchsreihe dargestellt, wobei die Höhe der Säulen den prozentualen Anteil gesunder Keimlinge 14 Tage nach der Aussaat zeigt ( $n = 150$ ). In Anlehnung an die von JENSEN *et al.* (2004) beschriebenen Versuche wurde als Kontrolle ein Hydro-Priming durchgeführt, bei dem die Samen in Wasser gequollen werden. Als zusätzliche Kontrolle diente auch hier eine Behandlung mit Aatiram® ( $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen).

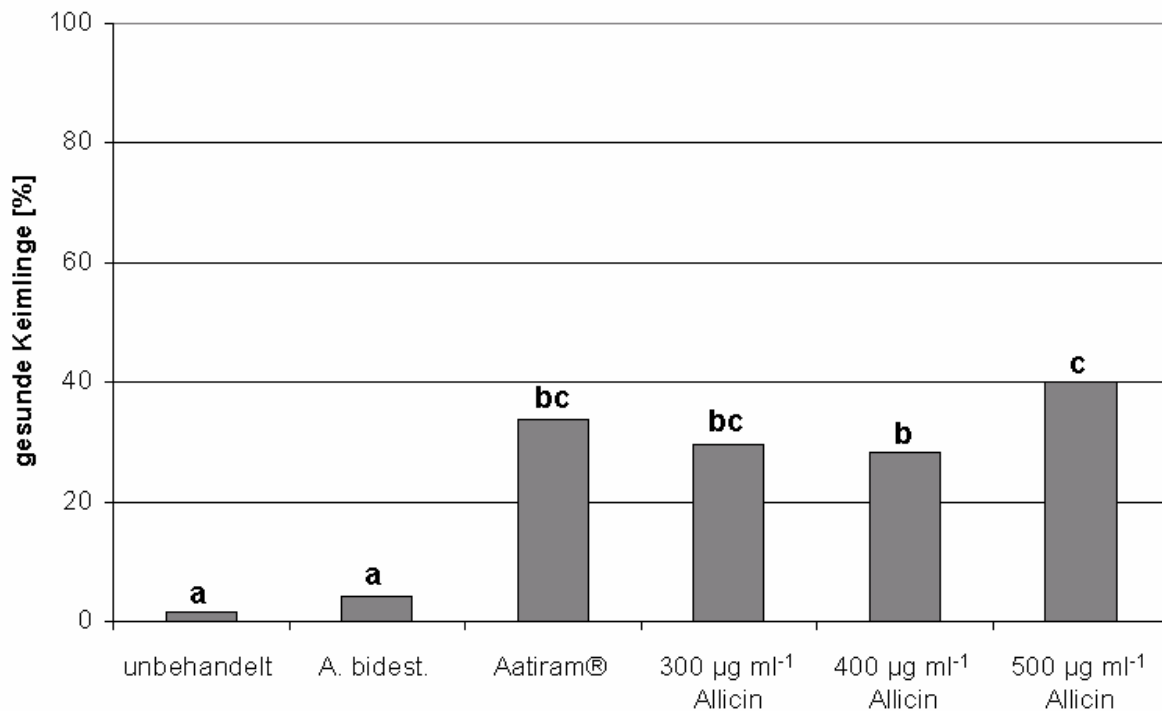


Abb. 28: Untersuchung zur Einbindung der Behandlung von Karottensamen mit verdünntem Knoblauchsaft in ein praxisübliches „Seed-Priming“-Verfahren

Dargestellt sind Mittelwerte der Prozent gesunder Keimlinge ( $n = 150$ ) aus mehreren Versuchen. Signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ). Neben der Wasser-Kontrolle wurde auch eine Variante mit Aatiram® ( $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen) behandelt.

Im Vergleich zu unbehandelten bzw. in Wasser gequollenen Samen, deren Keimrate unter 10% lag, zeigten alle behandelten Karottensamen ein deutlich verbessertes Auflaufen. Durch alle drei Knoblauchbehandlungen ( $300$ ,  $400$  und  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) konnte die Zahl gesunder Keimlinge auf 35-40% angehoben und somit signifikant verbessert werden. Die ermittelte Steigerung durch Quellen in Knoblauchsafte entsprach der, die durch eine Aatiram®-Behandlung erzielt werden konnte.

#### 4.3.4.4 Überprüfung des Einflusses verschiedener Quellzeiten

In den beschriebenen Versuchen zur Einbindung des Knoblauchsafte in ein „Seed-Priming“-Verfahren wurden die Karottensamen 16 h in der Flüssigkeit inkubiert. Wie bereits unter 4.3.4.3 erwähnt, wird die Behandlungsmethode jedoch von jeder Saatgut-Firma anders durchgeführt. Deshalb sollte getestet werden, ob eine Veränderung der Quellzeit einen Einfluss auf die Wirksamkeit des Knoblauchs hat. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

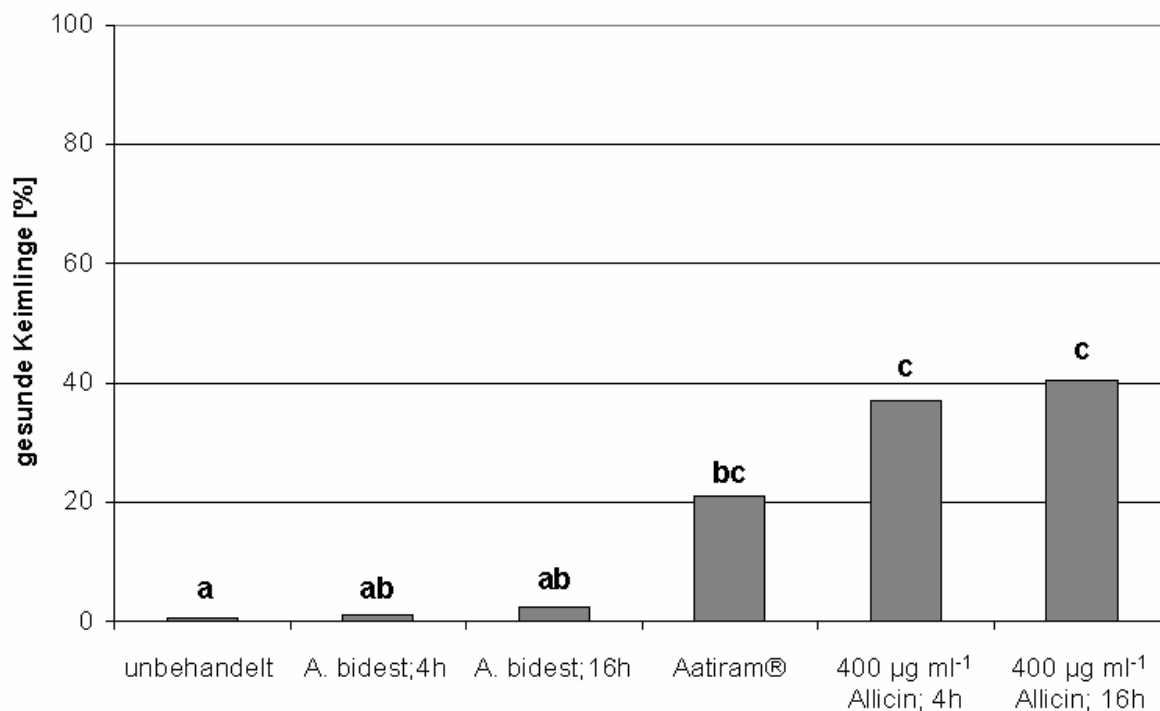


Abb. 29: Einfluss verschiedener Quellzeiten auf die Wirksamkeit von Knoblauchsafte bei der Samenbehandlung

Dargestellt sind Mittelwerte der Prozent gesunder Keimlinge ( $n = 150$ ) aus mehreren Versuchen. Signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ). Neben den Wasser-Kontrollen wurde auch eine Variante mit Aatiram® ( $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen) behandelt.

Auch diesmal konnte eine Behandlung der *Alternaria*-befallenen Karottensamen mit verdünntem Knoblauchsaff die Anzahl gesunder Keimlinge deutlich erhöhen. Zwischen einer Quellzeit von 4 h und 16 h konnte weder bei den Wasser-Kontrollen noch bei den Knoblauch-behandelten Samen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

#### 4.3.4.5 Untersuchungen zur Lagerfähigkeit behandelter Samen

Samen werden von Saatgutfirmen nicht unbedingt innerhalb weniger Tage verkauft und vom Landwirt ausgebracht. Aus diesem Grund ist es notwendig, sicherzustellen, dass behandeltes Saatgut auch nach einer längeren Lagerperiode weiterhin eine gute Keimfähigkeit und ein gesundes Keimlingswachstum aufweist. Um dies in Bezug auf die Knoblauch-behandelten Karottensamen zu testen, wurden diese nach sechs Monaten Lagerung bei  $10^\circ\text{C}$  erneut ausgesät und die Keimrate bestimmt (vgl. 3.5.3.2). In Abbildung 30 sind die Mittelwerte eines repräsentativen Versuchs dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass Aatiram®-behandelte Samen nur in diesem Experiment eingelagert wurden. Im Gegensatz zu allen anderen Varianten handelt es sich bei diesem Wert also nicht um den eines repräsentativen Versuchs.

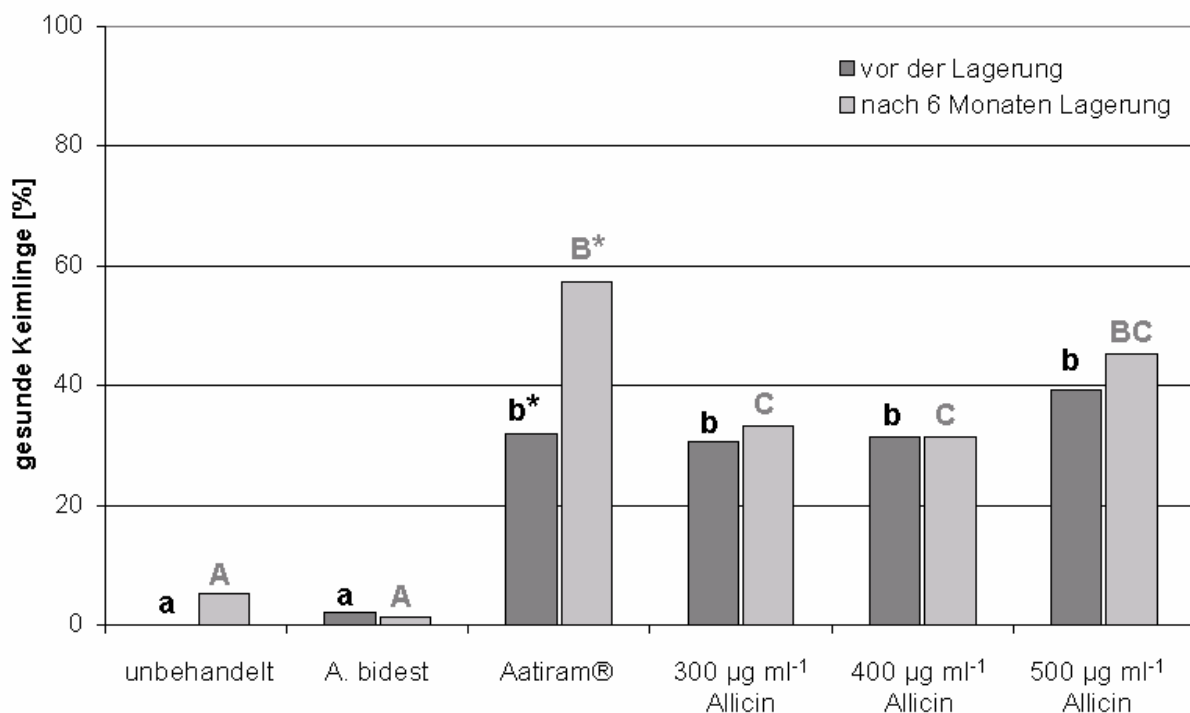


Abb. 30: Einfluss einer sechsmonatigen Lagerung bei  $10^\circ\text{C}$  auf die Anzahl gesunder Keimlinge von Karotten, die zuvor mit Knoblauchsaff behandelt wurden

Dargestellt sind Mittelwerte der Prozent gesunder Keimlinge ( $n = 150$ ) aus einem repräsentativen Versuch. Neben den Wasser-Kontrollen wurde auch eine Variante mit Aatiram® ( $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen) behandelt. Signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert, wobei die Ergebnisse vor (Klein-Buchstaben) und nach (Groß-Buchstaben) der Lagerung zunächst getrennt voneinander statistisch analysiert wurden (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ). Anschließend wurden die Ergebnisse vor und nach der Lagerung für jede Variante einzeln mit einander verglichen. Hier sind Varianten, deren Werte vor und nach der Lagerung signifikant voneinander abwichen durch ein Sternchen (\*) gekennzeichnet (Tukey-Test;  $p \leq 0,05$ ).

Nur bei der mit Aatiram® behandelten Variante ( $4 \text{ g kg}^{-1}$  Samen) war die Keimrate nach der sechsmonatigen Lagerung bei  $10^\circ\text{C}$  mit knapp 60% im Vergleich zur Keimung vor der Lagerung signifikant gestiegen. Bei allen anderen Varianten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gelagerten und direkt nach der Behandlung ausgesäten Samen festgestellt werden. In allen drei mit Knoblauchsaff behandelten Proben lag die Rate gesunder Keimlinge auch nach der halbjährigen Lagerung zwischen 35 und 40% und war somit drei- bis viermal höher als in unbehandelten oder in Wasser gequollenen Varianten.

#### **4.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Knoblauchsaffes bzw. des darin enthaltenen Allicins**

Neben Untersuchungen zur Wirksamkeit von möglichen Pflanzenschutzmitteln besteht auch immer ein Interesse daran, den oder die Wirkmechanismen solcher Substanzen aufzuklären. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl Pathogen-bezogene als auch allgemeine Ansätze unter Verwendung von Modellorganismen gewählt.

##### **4.4.1 Untersuchungen am Pathogen *Phytophthora infestans***

Für die Pathogen-bezogenen Untersuchungen zur Wirkungsweise von Knoblauch bzw. Allicin wurde *Phytophthora infestans* gewählt, da für dieses Pathogen die meisten Daten aus Infektionsversuchen (siehe 4.3.1) vorlagen. Es wurden sowohl *in vitro*-Untersuchungen als auch *in vivo*-Tests mit dem Pathosystem *Phytophthora infestans* / *Solanum lycopersicum* durchgeführt.

###### **4.4.1.1 Einfluss von Knoblauchsaff auf den Zoosporenschlupf von *Phytophthora infestans***

Die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Knoblauchsaff-Verdünnungen, die entsprechend unterschiedliche Allicin-Mengen beinhalteten, auf den Zoosporenschlupf von

*P. infestans* wurden wie unter 3.7.1. beschrieben durchgeführt. So wurden Sporangien-suspensionen mit verschiedenen Knoblauchsftverdünnungen versetzt und anschließend zur Induktion des Zoosporenschlupfs mehrere Stunden bei 10-12°C inkubiert, bevor die Anzahl leerer Sporangien bestimmt wurde. Der Vergleich der Anzahl leerer Sporangien vor und nach der Inkubation ergab die Schlupfrate. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 31 dargestellt. Bei dem gezeigten Diagramm handelt es sich um Mittelwerte aus mehreren Versuchen.

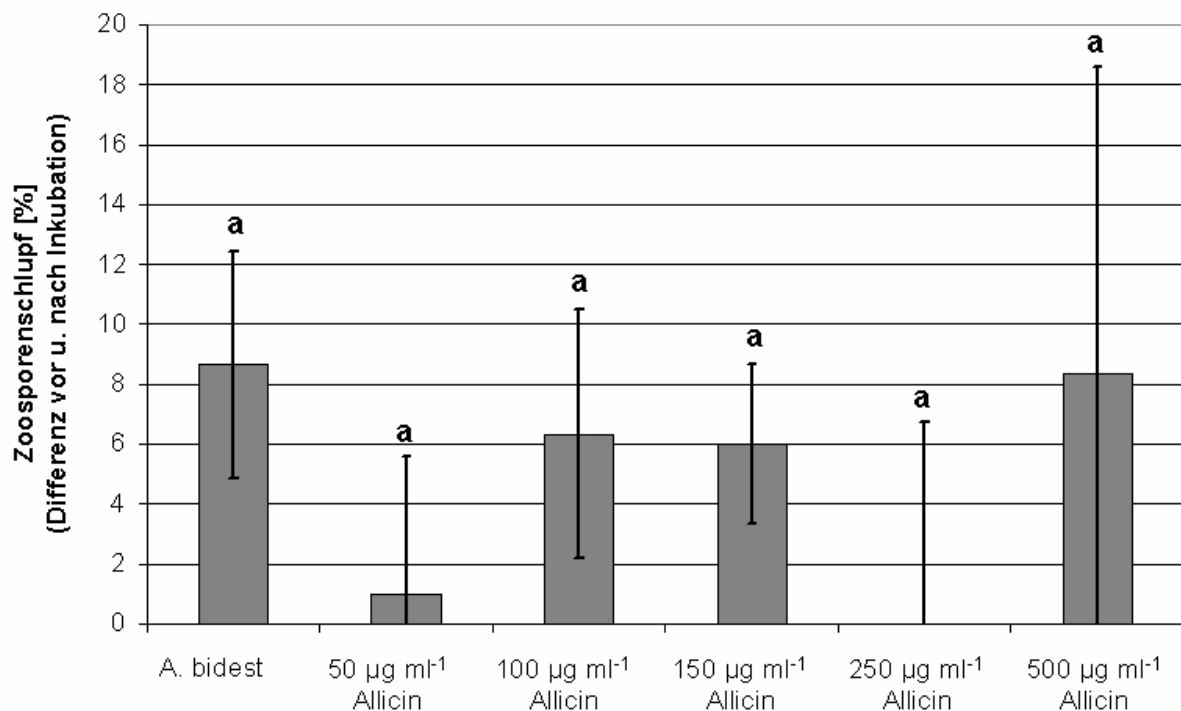


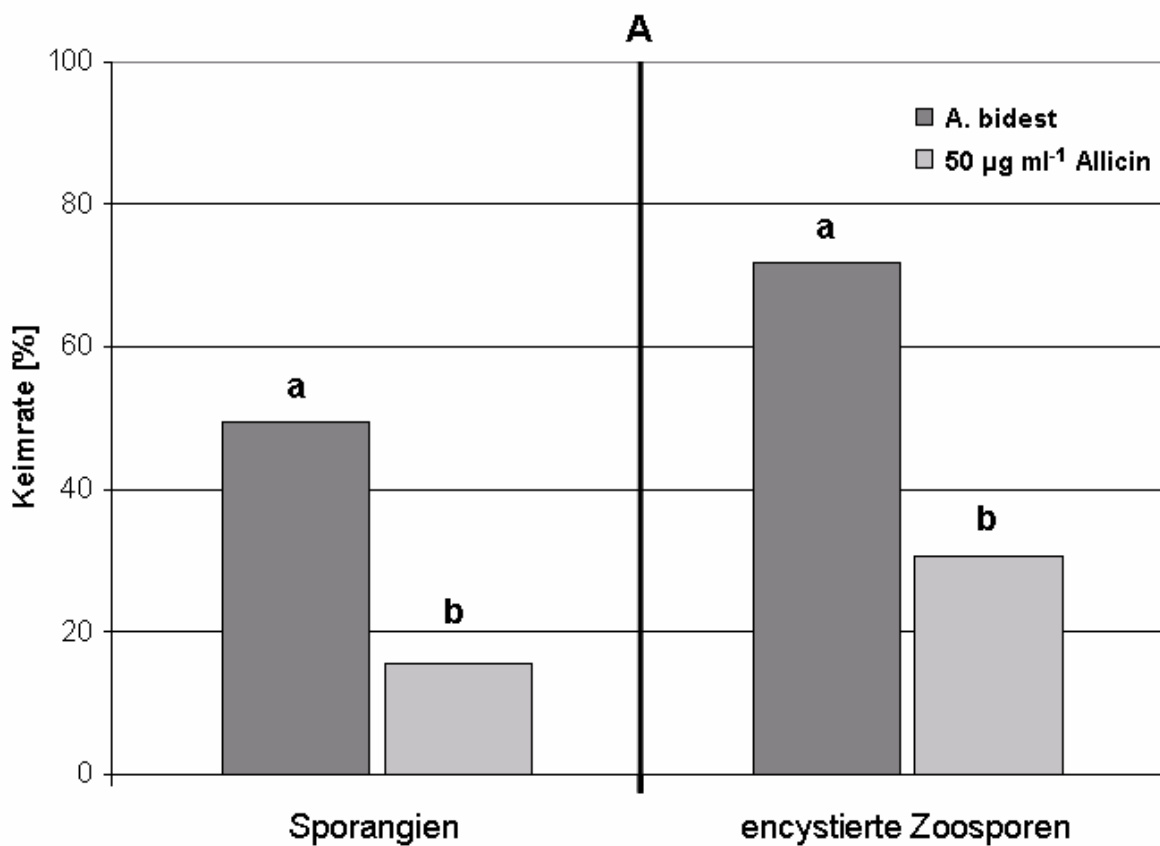
Abb. 31: Einfluss von Knoblauchsft auf den Zoosporenschlupf von *Phytophthora infestans* (*in vitro*)

Dargestellt sind Mittelwerte aus mehreren Versuchen. Signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ), darüber hinaus sind die Standardabweichungen der einzelnen Varianten mittels Fehlerbalken angezeigt.

Wie anhand der eingezeichneten Fehlerbalken zu erkennen ist, kam es bei den Versuchen zu relativ großen Schwankungen bezüglich der Sporenschlupfrate. Somit konnten keine signifikanten Unterschiede im Zoosporenschlupf zwischen unbehandelten und mit Knoblauchsft versetzten Sporangien-suspensionen festgestellt werden. Auch die Reduktion des Schlupfes von knapp 9% in der Wasser-Kontrolle auf 1% in der Variante mit 50 µg ml<sup>-1</sup> Allicin bzw. 0% bei einer Zugabe von 250 µg ml<sup>-1</sup> Allicin konnte aufgrund der starken Schwankungen statistisch nicht abgesichert werden.

#### 4.4.1.2 Einfluss von Knoblauchsafte auf die *in vitro*-Keimung von Sporangien bzw. encystierten Zoosporen von *Phytophthora infestans*

In Tests auf Agar-Platten wurde untersucht, ob durch eine Zugabe von Knoblauch und damit von bestimmten Allicin-Mengen zum Agar die Keimung von Sporangien und / oder von encystierten Zoosporen von *P. infestans* beeinflusst wird (siehe 3.7.2). In Abbildung 32 sind sowohl grafisch die Mittelwerte mehrerer Versuche als auch mikroskopische Aufnahmen unbehandelter und mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin Agar behandelter Sporangien bei einer 50-fachen Vergrößerung dargestellt.



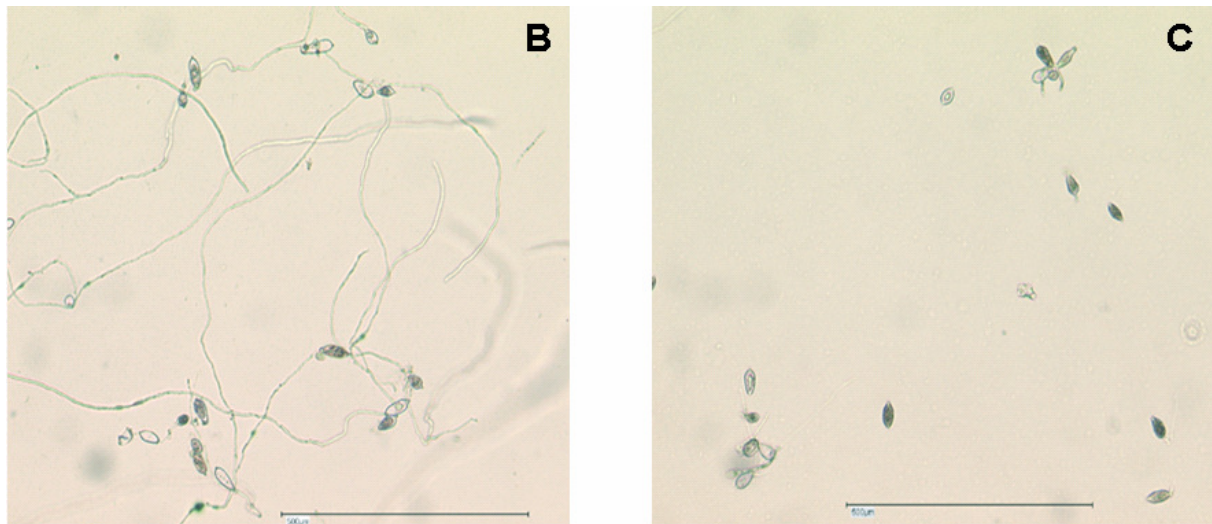


Abb. 32: Einfluss von Knoblauchsaff auf die Keimung von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* (*in vitro*)

**A:** Mittelwerte aus mehreren Versuchen, signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (t-Test,  $p \leq 0,05$ ),

**B:** mikroskopische Aufnahme un behandelter Sporangien, **C:** mikroskopische Aufnahme von Sporangien, die mit  $50 \mu\text{g Allicin ml}^{-1}$  Agar behandelt wurden; die eingezeichneten Balken entsprechen  $500 \mu\text{m}$  (Vergrößerung: 50-fach).

Durch die Zugabe von Knoblauchsaff zum Agar, so dass eine Allicin-Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  vorlag, sank die Keimrate der Sporangien von *P. infestans* von 50% auf weniger als 20% (Abb. 32 A). Eine solch signifikante Reduktion der Keimrate konnte ebenfalls bei den encystierten Zoosporen des Pathogens beobachtet werden. Hier verminderte sich der Anteil gekeimter Sporen von über 70% auf 30% (Abb 32 A). Der Unterschied in der Anzahl gebildeter Keimschläuche ist auch in den Mikroskopie-Bildern der Sporangien deutlich zu erkennen (Abb. 32 B und C).

#### 4.4.1.3 Einfluss von Knoblauchsaff auf das *in vitro*-Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *Phytophthora infestans*

Neben der Beeinflussung der Keimrate wurde mit Hilfe der beschriebenen *in vitro*-Tests auch eine mögliche Veränderung des Keimschlauchwachstums von Sporangien und encystierten Zoosporen durch eine Zugabe von Knoblauchsaff untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind Abbildung 33 zu entnehmen.

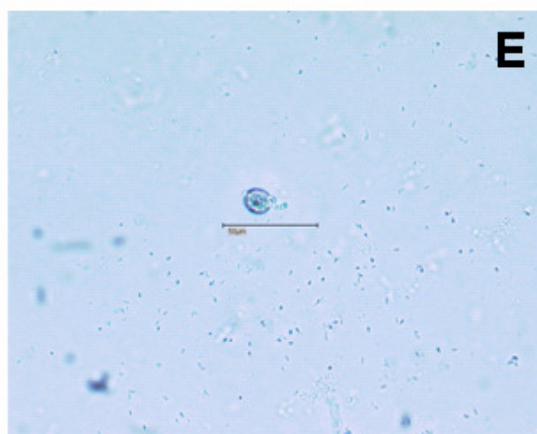
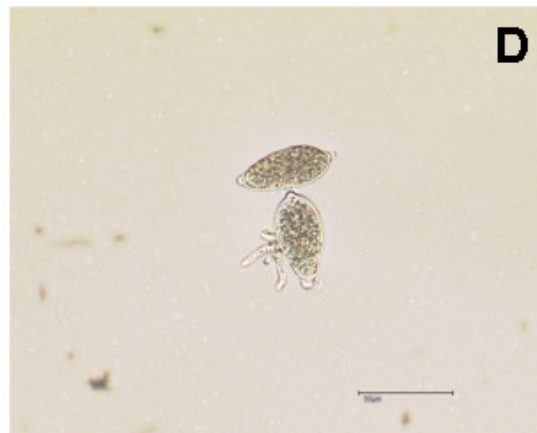
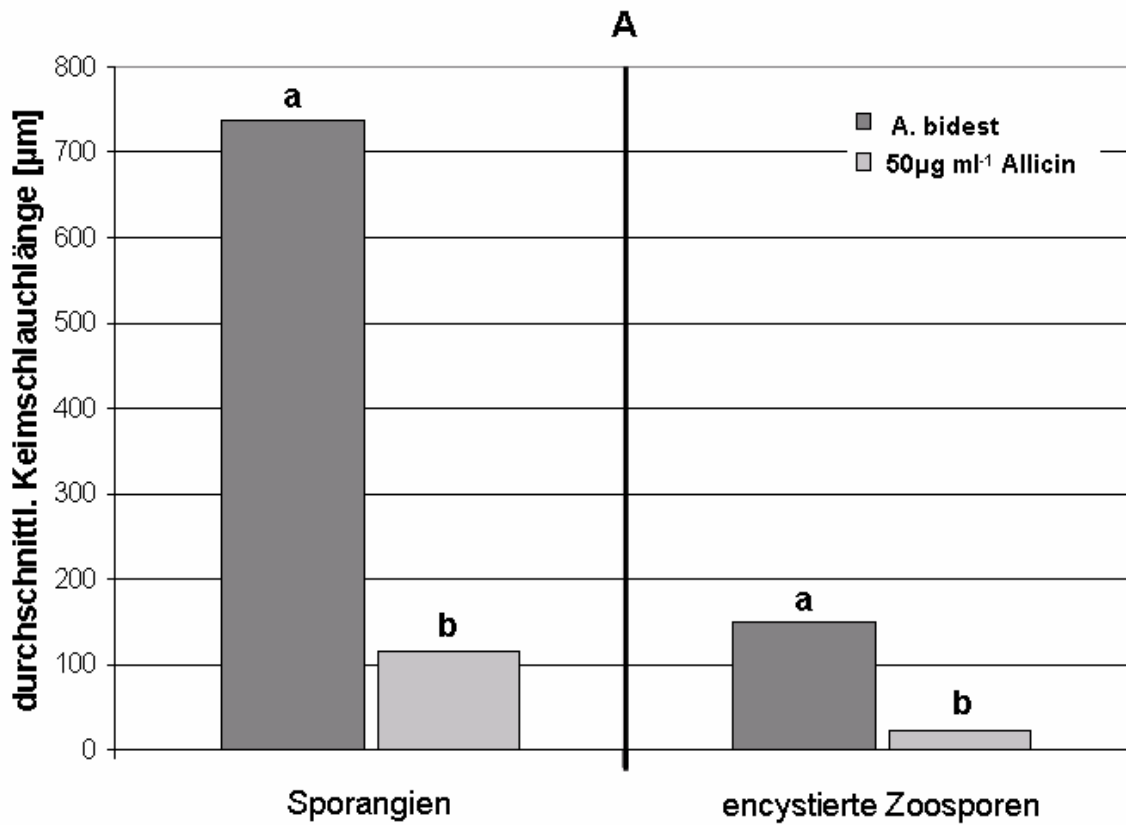


Abb. 33: Einfluss von Knoblauchsafte auf das Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* (*in vitro*)

**A:** Mittelwerte aus mehreren Versuchen, signifikant unterschiedliche Varianten sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Mann-Whitney Test,  $p \leq 0,05$ ), **B:** mikroskopische Aufnahme unbehandelter Sporangien, **C:** mikroskopische Aufnahme unbehandelter Zoosporen, **D:** mikroskopische Aufnahme mit  $50 \mu\text{g Allicin ml}^{-1}$  Agar behandelte Sporangien, **E:** mikroskopische Aufnahme mit  $50 \mu\text{g Allicin ml}^{-1}$  Agar behandelte Zoosporen; die eingezeichneten Balken entsprechen  $50 \mu\text{m}$  (Vergrößerung: 200-fach).

Wie in Abbildung 33 A-E zu sehen, wurde auch das Keimschlauchwachstum durch einen Allicingehalt von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  im Agar deutlich vermindert. So war das Wachstum der Keimschläuche bei Sporangien um ein Sechsfaches reduziert und auch die Keimschlauchlänge der encystierten Zoosporen sank von durchschnittlich  $150 \mu\text{m}$  auf etwa  $20 \mu\text{m}$ .

#### 4.4.1.4 Einfluss von Knoblauchsaft auf *in vivo*-Keimung und –Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *Phytophthora infestans*

Nach den Ergebnissen der *in vitro*-Tests sollte untersucht werden, ob der Einfluss von Knoblauchsaft ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) auf die Keimung und das Keimschlauchwachstums von *P. infestans* auch auf Tomatenpflanzen, also *in vivo*, beobachtet werden kann. Die zur Klärung dieser Frage durchgeführten Versuche wurden unter 3.7.3 beschrieben. Dabei wurden die Erregerstrukturen mit Hilfe der unter 3.7.3.2 beschriebenen Säurefuchsin-Färbung sichtbar gemacht. Die Mikroskopie-Ergebnisse sind im Folgenden zu sehen (Abb. 34 A-D).

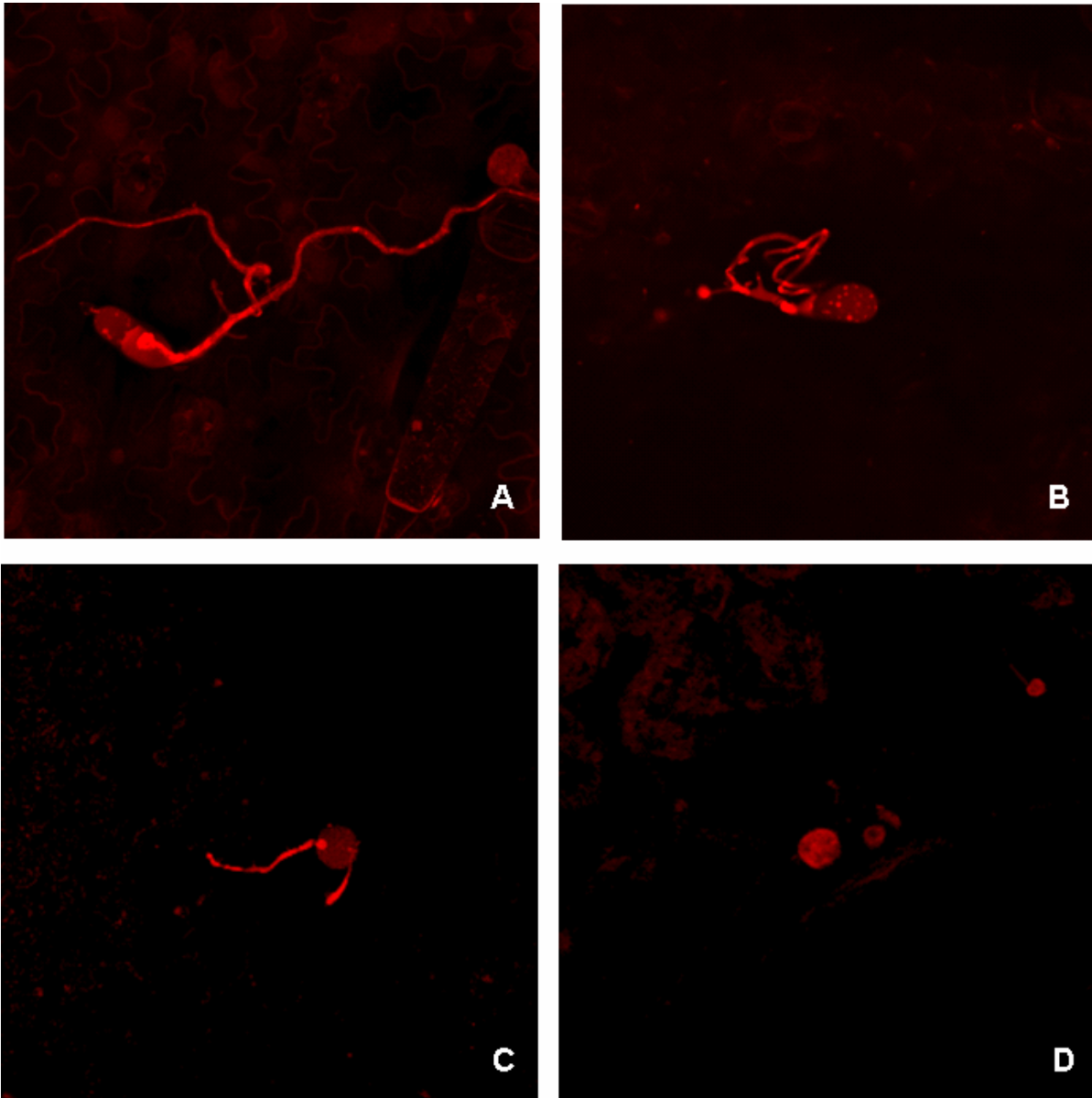


Abb. 34: Einfluss von Knoblauchsafte auf die Keimrate und das Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* auf Tomatenblättern (*in vivo*)

Die dargestellten Strukturen wurden durch Säurefuchsin angefärbt und mittels konvokaler Laser-Scan-Mikroskopie betrachtet (Anregung: 543 nm, Emission: 575-640 nm; Vergrößerung: Sporangien: 630-fach, Sporen: 1000-fach). **A:** mikroskopische Aufnahme von Sporangien auf unbehandelten Tomatenblättern, **B:** mikroskopische Aufnahme von Sporangien auf mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Alliin behandelten Tomatenblättern, **C:** mikroskopische Aufnahme encystierter Zoosporen auf unbehandelten Tomatenblättern, **D:** mikroskopische Aufnahme encystierter Zoosporen auf mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Alliin behandelten Tomatenblättern

Vergleicht man Abbildungen 34 A und B sowie C und D miteinander, so ist deutlich zu erkennen, dass das Keimschlauchwachstum auf den mit Knoblauch behandelten Tomatenblättern reduziert ist. Darüber hinaus konnte auch festgestellt werden, dass die Anzahl gekeimter Sporangien und Sporen bei Knoblauch-behandelten Proben deutlich geringer war als in der unbehandelten Kontrolle. Des Weiteren ließen sich auf unbehandelten Tomatenblättern mehr

Erregerstrukturen wiederfinden als auf solchen, die mit Knoblauchsft besprüht worden waren. Auf den behandelten Blättern war außerdem eine Art Film zu erkennen, der jedoch weder mikroskopisch noch fotografisch dokumentierbar war.

#### 4.4.2 Einsatz von Dithiotreitol (DTT) im Bioassay

Wie bei MIRON *et al.* (2002) beschrieben, geht das Allicin des Knoblauchs Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ein und kann so mit freien SH-Gruppen von Proteinen reagieren. Durch diese Wechselwirkung kann die Aktivität verschiedener Enzyme beeinflusst werden. So beschreiben z.B. ANKRI *et al.* (1997) eine starke Hemmung der Cysteinproteinasen und Alkoholdehydrogenasen von *Entamoeba histolytica*, dem Erreger der Amöbiasis (Amöbenruhr) beim Menschen. Weiterhin berichten die Autoren, dass sie die Hemmwirkung des Allicins durch eine Zugabe von Dithiotreitol (DTT) zu den verwendeten Zellysaten unterdrücken konnten.

Wäre die Hemmwirkung des Knoblauchsftes auf die im Bioassay verwendeten *E. coli*-Zellen auf die Modifikation freier SH-Gruppen wichtiger Enzyme durch das Allicin zurückzuführen, so müsste sich diese Wirkung ebenfalls durch den Einsatz von DTT reduzieren lassen. Um dies zu überprüfen, wurde der Bioassay, wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt, wobei dem LB-Agar verschiedene DTT-Konzentrationen zugegeben wurden. Abbildung 35 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

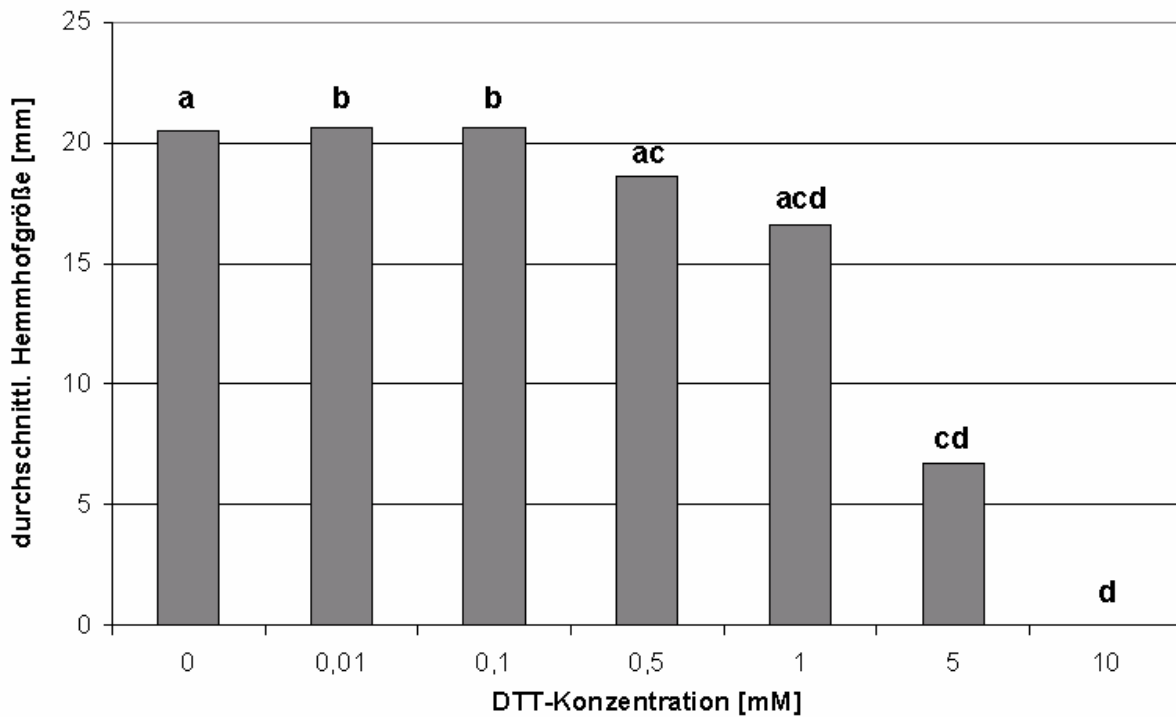


Abb. 35: Einfluss von DTT auf die Hemmwirkung von Knoblauchsaff gegenüber *E. coli*-Wachstum im Bioassay

Signifikante Unterschiede sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Dunn's Test,  $p \leq 0,05$ ).

Bei DTT-Konzentrationen im Agar von bis zu 1 mM konnte keine signifikante Reduktion der Hemmwirkung des Knoblauchsaffes auf das *E. coli*-Wachstum festgestellt werden. Eine Zugabe von DTT, so dass eine Endkonzentration von 5 mM erreicht wurde, verringerte den Hemmhofdurchmesser jedoch um ca. zwei Drittel. 10 mM DTT im Agar führten zur vollständigen Aufhebung der Hemmwirkung des Knoblauchsaffes.

#### 4.4.3 Untersuchungen am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* hinsichtlich einer Apoptose-Induktion

Sowohl SUN und WANG (2003) als auch ZHANG *et al.* (2006) konnten zeigen, dass Allicin in Abhängigkeit von der Dosis, Apoptose in Krebszellen auslöst. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch die Wirkung des Knoblauchsaffes gegen phytopathogene Pilze möglicherweise mit einer Apoptose-Induktion in Verbindung zu bringen ist. Als Angehöriger der *Protoascomyceten* bzw. *Saccharomyceten* zählt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zum Reich der Pilze. Da es sich hierbei auch im Bereich der Apoptose-Forschung (vgl. 1.3.1) um einen anerkannten Modellorganismus handelt, bot es sich an Hefezellen für die geplanten

Studien zu verwenden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, welche Mechanismen an der Apoptose-Induktion durch Knoblauch bzw. Allicin beteiligt sind.

#### 4.4.3.1 Untersuchungen zur Verschiebung des Redox- Potentials in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Der Redox-Status von Zellen hat laut SCHAFFER und BUETTNER (2001) einen Einfluss auf den biologischen Status der Zelle. So kann die Verschiebung zu einem oxidierten Zustand zur Induktion von Apoptose führen. Nach den Autoren kann das Redox-Paar GSSG / 2GSH (Glutathion), d.h. das Reduktionspotential ( $E_{hc}$ ) des Paares, als Indikator für den Redox-Status der Zelle dienen (s.a. 1.3). Neben der Reaktion mit freien Thiolgruppen von Enzymen (HAN *et al.*, 1993; ANKRI *et al.*, 1997) reagiert das Allicin auch mit der SH-Gruppe des reduzierten Glutathions (GSH) und führt so zur Bildung des Glutathion-Disulfids (GSSG) (JACOB, 2006). Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die in Pathogen-Versuchen eingesetzten Knoblauchsaff-Verdünnungen und die damit verbundenen Allicin-Konzentrationen das Reduktionspotential der Zellen ausreichend stark beeinflussen, um eine Apoptose-Induktion hervorzurufen. Hefe-Zellen wurden mit Knoblauchsaff behandelt, so dass in der Kultur eine Allicin-Konzentration vorlag, die in dem in Pathogen-Versuchen verwendeten Konzentrationsbereich lag. Um eine Nekrose der Zellen zu verhindern, was zur Folge hätte, dass keine Apoptose mehr stattfinden kann, wurde in Vorversuchen eine Allicin-Konzentration bestimmt, die das Wachstum deutlich hemmte, aber nicht zur völligen Stagnation führte. Diese Konzentration lag für den verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm RS 453 bei  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  (siehe 3.8).

Nach der Durchführung der unter 3.8.1 beschriebenen Versuche, konnte die mit Hilfe der Eichgeraden ermittelte Gleichung

$$y = 0,1148 x - 0,0055$$

verwendet werden, um den Gehalt an GSH und GSSG in unbehandelten und mit Knoblauchsaff behandelten Hefe-Zellen zu berechnen. Dabei war zu beachten, dass von den eingesetzten  $12,5 \mu\text{l}$  Probenvolumen lediglich 20% Zellen waren und davon wiederum 15% Zellwandmaterial. So ergab sich unter Einbeziehung dieser Überlegungen ein Probenvolumen von  $2,125 \mu\text{l}$ . Die berechnete Glutathion-Menge musste demnach noch mit 470,59 multipliziert werden, um die

Konzentration in  $\mu\text{g ml}^{-1}$  angeben zu können. Nahm man zusätzlich an, dass die Vakuole 20% des Zellvolumens ausmacht, kam man zu einem Probenvolumen von  $1,7 \mu\text{l}$  und einem Multiplikationsfaktor von 588,24. Da zur Berechnung des Reduktionspotentials die *Nernst-Gleichung* (s.u.) verwendet werden sollte, musste die Konzentration in Molarität umgerechnet werden. Dabei wurde für GSH ein Molekulargewicht von  $307,3 \text{ g mol}^{-1}$  und für GSSG von  $612,6 \text{ g mol}^{-1}$  eingesetzt. Nachdem so die absoluten Konzentrationen des gesamten Glutathions und des Disulfids (GSSG in der derivatisierten Probe) ermittelt worden waren, konnte durch Subtraktion des GSSG vom Gesamt-Glutathiongehalt auch die Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) berechnet werden. Bei dieser Rechnung war zu beachten, dass während der Nachweisreaktion ein Mol GSSG zu zwei Mol GSH reduziert wurde. Die Konzentration des GSSG musste also verdoppelt werden, bevor sie von der Gesamtmenge an Glutathion abgezogen werden konnte, um so die GSH-Konzentration zu bestimmen.

*Beispiel-Rechnung:*

[GSH]<sub>gesamt</sub>:

$$\begin{aligned} 1,49 \mu\text{g} * 470,59 &= 701,2 \mu\text{g ml}^{-1} \\ 701,2 \mu\text{g ml}^{-1} / 307,3 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1} &= 2,31 \mu\text{mol ml}^{-1} \\ &\rightarrow \mathbf{2,31 \text{ mM}} \end{aligned}$$

[GSSG]:

$$\begin{aligned} 0,68 \mu\text{g} * 470,59 &= 320,0 \mu\text{g ml}^{-1} \\ 320,0 \mu\text{g ml}^{-1} / 612,6 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1} &= 0,52 \mu\text{mol ml}^{-1} \\ &\rightarrow \mathbf{0,52 \text{ mM (0,00052 M)}} \end{aligned}$$

[GSH]:

$$2,31 \text{ mM} - (2 * 0,52 \text{ mM}) = \mathbf{1,27 \text{ mM (0,0013 M)}}$$

Dann konnte das Reduktionspotential des GSSG / 2GSH-Paares mit Hilfe der *Nernst-Gleichung*

$$E_{\text{nc}} = -240 - \frac{59,1}{2} \log \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]} \quad \text{mV}$$

berechnet werden.

*Beispiel-Rechnung:*

$$\begin{aligned}
 E_{hc} &= -240 - (59,5 / 2) * \log (0,0013^2 / 0,00052) \text{ mV} \\
 &= -240 - 29,55 * (-2,51) \text{ mV} \\
 &= -240 + 74,23 \text{ mV} \\
 &= \underline{\underline{-165,8 \text{ mV}}}
 \end{aligned}$$

Es ergaben sich die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte.

	GSSG + GSH [mM]		GSSG [mM]		GSH [mM]		Red.potential [mV]	
		- 20% Vol.		- 20% Vol.		- 20% Vol.		- 20% Vol.
unbehandelt	2,54	3,18	-	-	-	-	≤ - 200	≤ - 200
mit Allicin	2,31	2,89	0,52	0,68	1,27	1,53	- 165,8	- 167

Tab. 10: Ergebnisse der Glutathion-Messungen in unbehandelten und mit Knoblauchsaff behandelten Hefe-Zellen (RS453)

Es sind sowohl Werte angegeben, bei denen das Vorhandensein von Vakuolen ignoriert wurde, als auch Werte, bei denen angenommen wurde, dass die Vakuole 20% des Zellvolumens ausmacht und entsprechend vom Probenvolumen abgezogen wurde (-20% Vol.).

So ergab sich für mit Knoblauch behandelte Zellen ein Reduktionspotential zwischen – 165,8 und – 167 mV. In den unbehandelten Zellen konnte kein GSSG nachgewiesen werden. Würde man jedoch in die Nernst-Gleichung eine GSSG-Menge von 0 einsetzen, ergäbe sich ein Reduktionspotential von  $E_{hc} = -\infty$ . Da dies unrealistisch ist wurde für die unbehandelten Zellen ein Reduktionspotential von  $\leq -200$  mV angenommen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Gesamtmenge an Glutathion durch die Knoblauchbehandlung von 2,54 – 3,18 mM auf 2,31 – 2,89 mM reduziert wurde.

#### 4.4.3.2 Nachweis apoptotischer Hefezellen durch Anfärbung aktiver Caspasen (Caspase-Assay)

Bei der Induktion von Apoptose spielt die Aktivierung von Caspasen eine zentrale Rolle. Somit können aktive Caspasen, wie sie mit Hilfe des unter 3.8.2 beschriebenen Caspase-Assays nachgewiesen werden, als charakteristisches Merkmal für apoptotische Zellen angesehen werden. Abbildung 36 zeigt Aufnahmen von Hefezellen des Stammes RS453 nach einer Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 mM Endkonzentration in der Kultur; Positiv-Kontrolle) bzw.

Knoblauchsft (50 bzw. 200  $\mu\text{g}$  Allicin  $\text{ml}^{-1}$  Kultur) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Negativ-Kontrolle). In Abbildung 37 sind die Ergebnisse eines Parallel-Versuchs mit Zellen des Hefe-Stammes SS330 dargestellt. Da dieser Stamm in den bereits erwähnten Vorversuchen (vgl. 3.8 und 4.4.3.1) zur Ermittlung einer nutzbaren Allicin-Konzentration deutlich empfindlicher reagiert hatte, wurden bei Versuchen mit diesem Stamm lediglich 50  $\mu\text{g}$  Allicin  $\text{ml}^{-1}$  Kultur eingesetzt. Darüber hinaus wurden zusätzlich zu den bereits genannten Varianten auch Zellen mit reinem Allicin behandelt. Sämtliche Proben wurden dem genannten Caspase-Assay unterzogen, so dass Zellen mit aktiven Caspasen an einer roten Färbung zu erkennen sind.

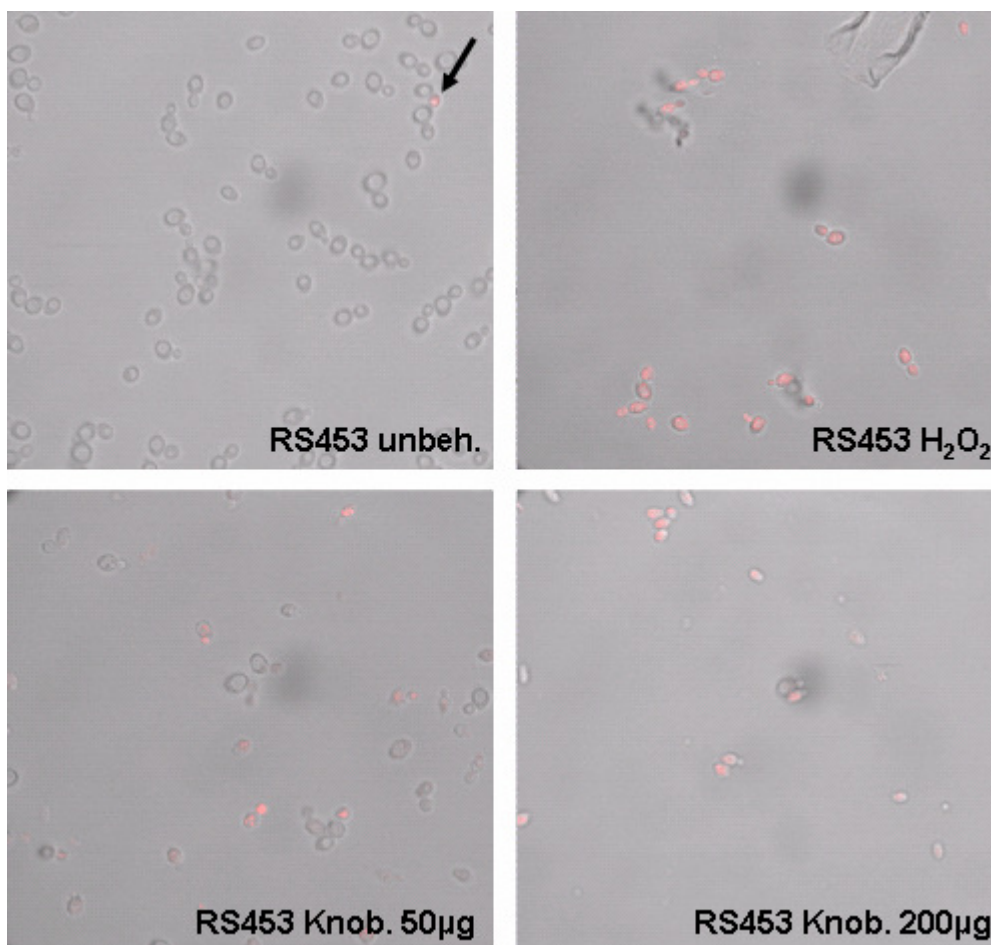


Abb. 36: Hefe-Zellen des Stammes RS453 unbehandelt, nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. Knoblauch und anschliendem Caspase-Assay

Aufgenommen mit konvokalem Laser-Scan-Mikroskop (Anregung: 488 nm und 568 nm; Emission: 590-610 nm) bei 630-facher Vergrößerung; aktive Caspasen sind durch SR-FLICA<sup>TM</sup> rot gefärbt.

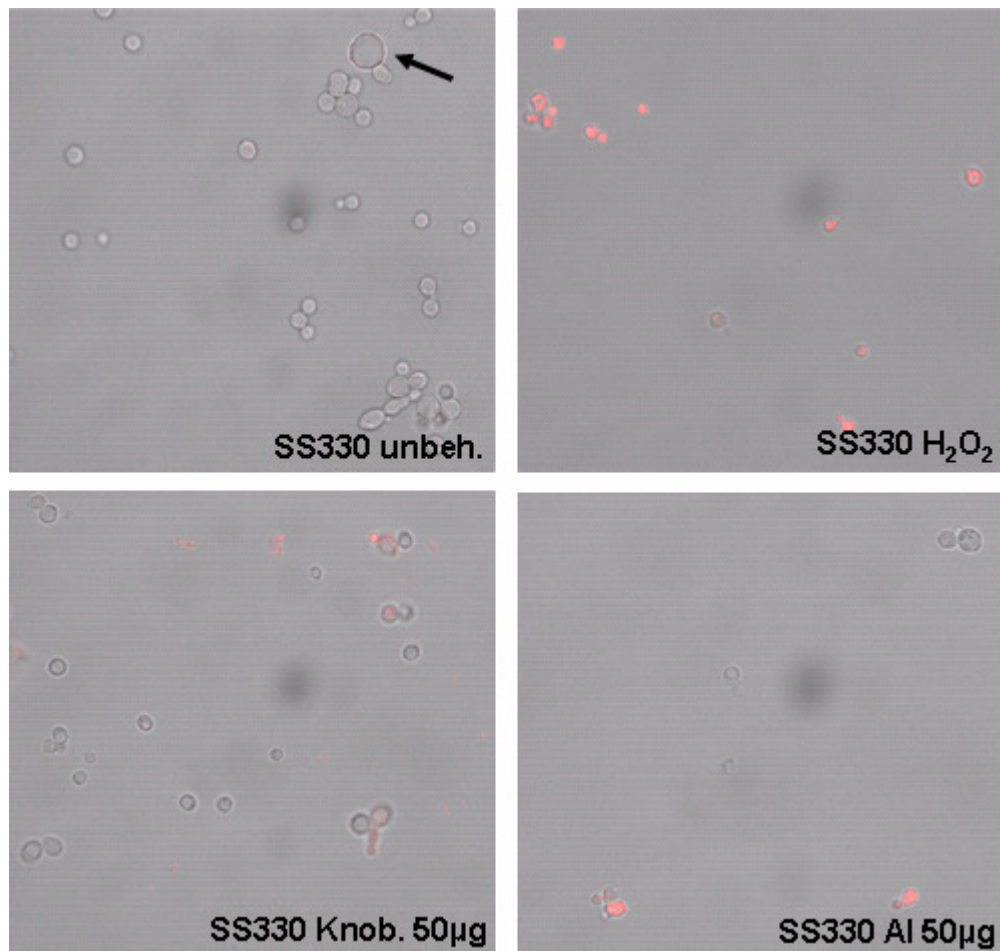


Abb. 37: Hefe-Zellen des Stammes SS330 unbehandelt, nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Knoblauchsft bzw. reinem Allicin und anschließendem Caspase-Assay

Aufgenommen mit konvokalem Laser-Scan-Mikroskop (Anregung: 488 nm und 568 nm; Emission: 590-610 nm) bei 630-facher Vergrößerung; aktive Caspasen sind durch SR-FLICA™ rot gefärbt; Knob. = Behandlung mit Knoblauchsft, Al = Behandlung mit reinem Allicin

Bei beiden Stämmen waren in der unbehandelten Kontrollvariante so gut wie keine gefärbten Zellen zu erkennen. Im Gegensatz dazu waren bei Proben, die mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt wurden, nahezu alle Zellen rot gefärbt. Gab man Knoblauchsft zu den Hefe-Zellen, so dass in der Kultur eine Allicin-Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  vorlag, so wiesen einige Zellen eine Färbung auf. Erhöhte man die Menge an Knoblauchsft in Kulturen des Stammes RS453, so dass die Allicin-Konzentration auf  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  stieg, konnten etwa 90% der Zellen des Stammes mit SR-FLICA™ markiert werden. Nach einer Inkubation des Stammes SS330 mit  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  reinem Allicin im Medium konnten etwa gleich viele Zellen mit dem Reagenz angefärbt werden, wie in SS330-Kulturen, die so mit Knoblauchsft versetzt worden waren, das ebenfalls eine Allicin-Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  vorlag. Die Intensität der Färbung fiel jedoch bei reinem Allicin etwas stärker aus.

## 4.5 Synthese der Alliinase aus Knoblauch in Fremdorganismen

Neben den phytopathologischen Versuchen zum möglichen Einsatz des Knoblauchs, insbesondere des Allicins, sollte auch ein molekularbiologischer Ansatz zu diesem Thema untersucht werden. Dieser sollte klären, ob die Synthese einer aktiven Knoblauch-Alliinase in Fremdorganismen möglich ist. Wäre dies der Fall, so bestünde zukünftig die Möglichkeit, die Knoblauch-Alliinase in Nutzpflanzen einzubringen. Auf diese Weise könnten die Pflanzen durch eine Behandlung mit Alliin, welches im Vergleich zum Allicin deutlich stabiler und leichter synthetisierbar ist, vor dem Angriff phytopathogener Organismen geschützt werden. Da es sich bei Alliin um ein Cystein-Derivat handelt, könnte man sich auch vorstellen, ausgehend von der Möglichkeit eine aktive Alliinase in Fremd-Pflanzen herstellen zu können, den gesamten Syntheseweg des Allicins zu klonieren und so resistente Pflanzen zu erzeugen.

In der vorliegenden Arbeit wurde aus Knoblauchzehen isolierte RNA wie unter 3.9.3.1 und 3.9.3.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben und diente als Matrize für die Amplifikation des Alliinasegens. Ein Vergleich mit zwei veröffentlichten cDNA-Sequenzen (VAN DAMME *et al.*, 1992; RABINKOV *et al.*, 1994) zeigte, dass Abweichungen von der einen oder anderen Sequenz sowohl in der Basenpaarabfolge als auch in der Aminosäuresequenz vorkamen (Anhang 3). Da die Alliinase von einer Genfamilie kodiert wird (siehe Kapitel 1.1) und darüber hinaus die selbst hergestellte Sequenz immer mit einer der beiden veröffentlichten Sequenzen übereinstimmte, also in keinem Fall von beiden abwich, wurde die eigene Sequenz als ebenfalls korrekt angesehen und für weitere Klonierungen verwendet. In der Literatur wurde außerdem beschrieben, dass das Alliinasegen auch für ein Sortierungssignal kodiert, welches dem Transport des Enzyms an seinen Zielort dienen könnte (VAN DAMME *et al.* (1992)). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu der bereits erwähnten Sequenz für die „reife“ Alliinase (Al) eine weitere cDNA amplifiziert, die auch die Signalsequenz trug (Al+TS2). Auch diese wurde wie oben beschrieben überprüft und für korrekt befunden. Vor der Überprüfung wurden die Sequenzstücke in einen Klonierungsvektor eingebracht und in *E. coli* vermehrt. Pro Konstrukt wurde mit zwei Plasmiden weitergearbeitet, die aus verschiedenen *E. coli*-Klonen isoliert worden waren. Es wurden die Klone Al 1, Al 6, Al+TS2 3 und Al+TS2 12 ausgewählt. Aus den isolierten Plasmiden wurde die Alliinasesequenz mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert. Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Kapitel 3.9 detailliert beschrieben und unter 3.9.4 zusammengefasst. Darüber hinaus informieren die Tabellen 2 und 6 über die verwendeten Vektoren.

#### 4.5.1 Synthese der Alliinase in *Saccharomyces cerevisiae*

Da die Transformation und Selektion von Pflanzen eine längere Zeit in Anspruch nimmt, sollte das Alliinasegen parallel in den eukaryotischen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* eingebracht werden. Aufgrund einer deutlich kürzeren Reproduktionszeit der Hefe sollte diese Methode schon früh erste Aussagen über die Alliinase-Synthese in Fremdorganismen zulassen.

Der Hefe-Expressionsvektor pFL61, in den zuvor das Alliinase-Gen mit (AI+TS2) und ohne (AI) Signalsequenz eingefügt worden war (Abb. 38), wurde in *E. coli* vermehrt und anschließend durch Co-Transformation mit Heringssperm-DNA in Hefezellen des Stammes RS453 eingebracht (siehe 3.9.3.9). Es wurden Plasmide aus den folgenden *E. coli*-Klonen aufgereinigt und in Hefe-Zellen kloniert: pFL61/AI 1.5, pFL61/AI 6.5, pFL61/AI+TS2 3.2 und pFL61/AI+TS2 12.2. Der Vektor enthält den Phosphoglyceratkinase-Promotor und –Terminator, den Replikationsursprung des 2  $\mu$ m-Hefepiasmids sowie das Ampicillinresistenzgen und das *URA3*-Gen als Selektionsmarker in Bakterien und Hefen.



Abb. 38: Plasmidkarten der pFL61-Vektoren, die das Alliinasegen mit (AI+TS2) und ohne (AI) Signalsequenz beinhalten und zur Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen des Stammes RS453 verwendet wurden

PGK-Prom. = Phosphoglyceratkinase-Promotor, PGK-Term. = Phosphoglyceratkinase Terminator, 2  $\mu$  = Replikationsstart

##### 4.5.1.1 Nachweis des Proteins (Alliinase) mittels Western Blot

Nachdem die Hefe-Zellen mit den beschriebenen Plasmiden transformiert worden und mehrere Kolonien auf Selektionsmedium gewachsen waren, wurden diese in Flüssigkultur gebracht und Proteinextrakte hergestellt (siehe 3.10.1.1). Diese Extrakte wurden mittels Western Blot-

Verfahren (3.10.4) analysiert, bei dem ein Alliinase-spezifischer Antikörper verwendet wurde. Das Ergebnis ist im Folgenden dargestellt.

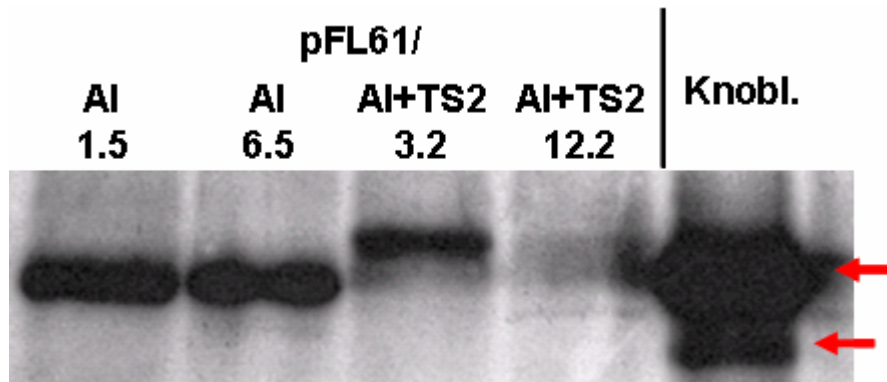


Abb. 39: Western Blot von Proteinextrakten aus transgenen Hefen zur Überprüfung der Alliinase-Produktion

Positiv-Kontrolle: Proteinextraktion aus Knoblauchzehen (Knobl.), AI = Alliinase, AI+TS2 = Alliinase mit Signalsequenz; Nummerierung = *E. coli*-Klon, aus dem die Plasmid-DNA für die Hefe-Transformation isoliert wurde

Der Proteinextrakt aus Knoblauch wies zwei Banden (siehe Pfeile in Abb. 39) auf, die vom Alliinase-spezifischen Antikörper erkannt und somit markiert wurden. Beide Hefe-Klone, die die reine Alliinase-Sequenz beinhalten sollten, zeigten im Western Blot eine deutliche Bande in Höhe der oberen Knoblauch-Bande. Im Gegensatz dazu lag die Bande der mit pFL61/AI+TS2 3.2 transformierten Hefe-Zellen deutlich über der oberen Knoblauch-Bande. Allerdings war hier auch eine schwache Bande in Höhe der oberen Bande des Extraktes aus Knoblauch zu sehen. Ebenso verhielt es sich für die Zellen, die das Plasmid pFL61/AI+TS2 12.2 aufgenommen haben sollten. Bei diesen fielen die Banden jedoch wesentlich schwächer aus und waren nicht klar voneinander getrennt. Zusätzlich war noch eine dritte Bande unterhalb der beiden genannten zu erkennen.

#### 4.5.1.2 Aktivitätstest der „Hefe-Alliinase“

Die Untersuchungen zur Aktivität der transgenen Alliinase wurden mit Proteinextrakten des Hefe-Klons AI 1.5 durchgeführt. Weder das unverdünnte Protein noch die verschiedenen Verdünnungen (siehe 3.10.1.2) zeigten jedoch eine messbare Aktivität im Alliinase-Assay (siehe 3.10.5.1).

#### 4.5.2 Synthese der Alliinase in *Arabidopsis thaliana*

Um zu klären, ob es möglich ist das Alliinasegen aus Knoblauch in anderen Pflanzenspezies zu exprimieren und auf diese Weise ein aktives Enzym zu produzieren, wurde das Gen sowohl mit Signalsequenz (AI+TS2) als auch ohne (AI) in den Pflanzen-Expressionsvektor pCHF1 kloniert (Abb. 40). Das Plasmid beinhaltet den 35S CaMV-Promotor, den RbcS-Terminator sowie das Gentamycin- und Spectinomycinresistenzgen als Selektionsmarker in Bakterien bzw. Pflanzen. Mittels Agrobakterien-Transformation sollten die entstandenen Vektoren in Pflanzen des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* der Ökotypen „Columbia“ (Col-0) und „Landsberg erecta“ (Ler-0) eingebracht werden (siehe 3.9.3.9). Es wurden die folgenden Agrobakterien-Klone verwendet: pCHF1/AI 1.4 und 6.3, pCHF1/AI+TS2 3.2 und 12.1.

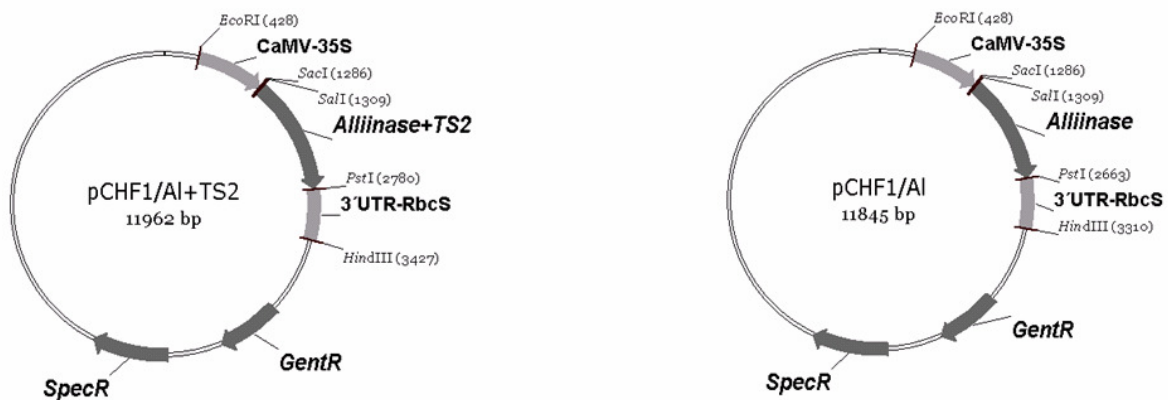


Abb. 40: Plasmidkarten der pCHF1-Vektoren, die das Alliinasegen mit (AI+TS2) und ohne (AI) Signalsequenz beinhalten und zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* verwendet wurden  
CaMV-35S = Promotor, 3'UTR-RbcS = Terminator

4.5.2.1 Selektion von Pflanzen, die bezüglich des Alliinasegens homozygot sind  
Pro Plasmid wurden je Ökotyp 15 Pflanzen transformiert und bis zur Samenreife weiter kultiviert. Nachdem die Samen dieser Pflanzen geerntet worden waren, wurden sie auf Selektionsmedium ausgesät, um diejenigen zu selektieren, bei denen die Transformation positiv verlaufen war (3.3.2.2). So konnten insgesamt 49 Pflanzen der T1-Generation angezogen und bis zur Samenreife kultiviert werden. Tabelle 11 zeigt die Verteilung der transgenen Pflanzenlinien innerhalb der Ökotypen und Plasmide.

<b>Columbia</b>		<b>Landsberg erecta</b>	
Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen	Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen
pCHF1/A1	16	pCHF1/A1	10
pCHF1/A1+TS2	12	pCHF1/A1+TS2	11

Tab. 11: Verteilung selektierter T1-Pflanzen

Die zweite Selektion erbrachte 26 Linien der T2-Generation, die, auf Selektionsmedium angezogen, eine Aufspaltung im ungefähren Verhältnis 3:1 zeigten (Verteilung siehe Tab. 12). Von diesen Linien wurden jeweils 15 Pflanzen pikiert und bis zur Samenreife kultiviert.

<b>Columbia</b>		<b>Landsberg erecta</b>	
Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen	Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen
pCHF1/A1	6	pCHF1/A1	6
pCHF1/A1+TS2	6	pCHF1/A1+TS2	8

Tab. 12: Verteilung selektierter T2-Pflanzen

Nach der dritten Selektion blieben 84 Pflanzen übrig, bei denen alle Nachkommen auf Selektionsmedium überlebten (Verteilung siehe Tab. 13). Bei diesen konnte davon ausgegangen werden, dass sie für das Alliinase-Gen homozygot sind. Es wurden 23 unabhängige Transformanten für die weiteren Analysen ausgewählt und, wie in Tabelle 14 aufgelistet, nummeriert.

<b>Columbia</b>		<b>Landsberg erecta</b>	
Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen	Plasmid	Anzahl selektierter Pflanzen
pCHF1/A1	28	pCHF1/A1	19
pCHF1/A1+TS2	19	pCHF1/A1+TS2	18

Tab. 13: Verteilung selektierter T3-Pflanzen (Homozygote)

Columbia		Landsberg erecta	
Nummerierung bei Analyse	Linien-Bezeichnung	Nummerierung bei Analyse	Linien-Bezeichnung
1	AI+TS2 12.1 6/14	1	AI+TS2 3.2 3/14
2	AI+TS2 3.2 6/1	2	AI+TS2 12.1 9/11
3	AI+TS2 12.1 3/9	3	AI+TS2 3.2 1/2
4	AI+TS2 3.2 10/1	4	AI+TS2 12.1 2/10
5	AI+TS2 3.2 6/9	5	AI+TS2 12.1 6/12
6	AI+TS2 12.1 10/6	6	AI+TS2 12.1 7/6
7	AI 1.4 1/3	7	AI 6.3 6/7
8	AI 6.3 4/15	8	AI 6.3 14/6
9	AI 1.4 2/5	9	AI 1.4 1/5
10	AI 6.3 2/11	10	AI 6.3 5/13
11	AI 6.3 10/9	11	AI 1.4 8/12
12	AI 1.4 15/8		

Tab. 14: Nummerierung der homozygoten *Arabidopsis*-Linien (Alliinase-Transformanten) für molekularbiologische Analysen

#### 4.5.2.2 Nachweis des Transgens in homozygoten Pflanzen mittels PCR

Zu Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen der homozygoten *Arabidopsis*-Linien sollte getestet werden, welche der Linien das Alliinasegen tatsächlich ins Genom eingebaut hatten. Dazu wurde genomische DNA aus den Pflanzen isoliert (3.9.1.2) und eine PCR mit den Primern, die bereits zur Amplifikation des Gens aus Knoblauch-cDNA verwendet worden waren (siehe Tab. 3), durchgeführt. Die anschließende Gelelektrophorese erbrachte das in Abbildung 41 dargestellte Bandenmuster. Die erwarteten Molekulargewichte der Fragmente lagen für die Alliinase-Sequenz alleine (AI) bei 1340 bp und mit einer putativen Signalsequenz (AI+TS2) bei 1460 bp. Um sicher zu gehen, dass fehlende Banden nicht auf eine mangelhafte DNA-Extraktion zurückzuführen waren, wurde parallel eine PCR mit Primern für das konstitutiv exprimierte Gen, der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus *Arabidopsis thaliana* (AT3G26650) angesetzt. Das hier erwartete Fragment sollte eine Größe von ca. 300 bp aufweisen und in allen transformierten Linien sowie im Wildtyp zu finden sein (Abb. 42). Im Gegensatz dazu konnte mit den für das Alliinasegen spezifischen Primern lediglich in erfolgreich transformierten Pflanzen ein Fragment amplifiziert werden.

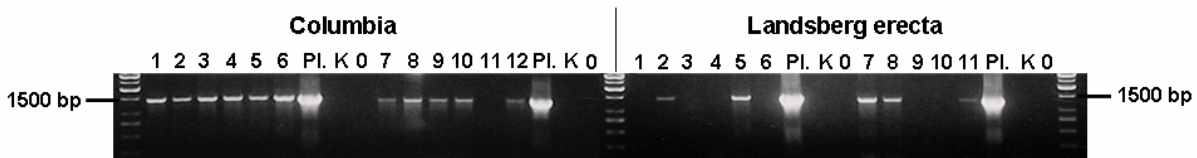


Abb. 41: PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und Alliinase-spezifischen Primern

erwartete Banden: A1 (Alliinase): 1340 bp, A1+TS2 (Alliinase+Signalsequenz): 1460 bp;  
Pl. = Plasmid als Positiv-Kontrolle, K = Wasser-Kontrolle, 0 = Wildtyp-DNA

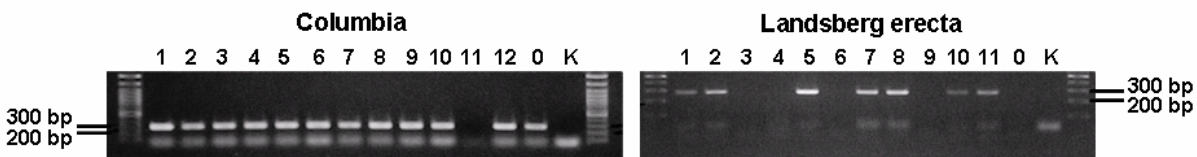


Abb. 42: PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und GAPDH-spezifischen Primern

erwartete Bande: 300 bp; 0 = Wildtyp-DNA, K = Wasser-Kontrolle

Alle Transformanten des Ökotyps „Columbia“ wiesen in beiden PCR die erwarteten Banden auf. Eine Ausnahme stellte lediglich Linie 11 dar, die in beiden Versuchen keine Bande zeigte. Unter den Transformanten des Ökotyps „Landsberg erecta“ konnten mit der ersten PCR bei den Linien 2, 5, 7, 8 und 11 Fragmente mit 1460 bp bzw. 1340 bp amplifiziert werden. In der Kontroll-PCR mit den GAPDH-Primern wiesen zusätzlich noch die Linien 1 und 10 Fragmente in der erwarteten Größe auf. In beiden Wildtyp-Pflanzen konnten mit Alliinase-spezifischen Primern keine Fragmente amplifiziert werden, wohingegen die PCR mit GAPDH-Primern Banden in der erwarteten Höhe von 300 bp erbrachte.

Von den Linien, die auch in der Kontroll-PCR keine Banden gezeigt hatten, wurde erneut genomische DNA isoliert und beide PCR wiederholt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

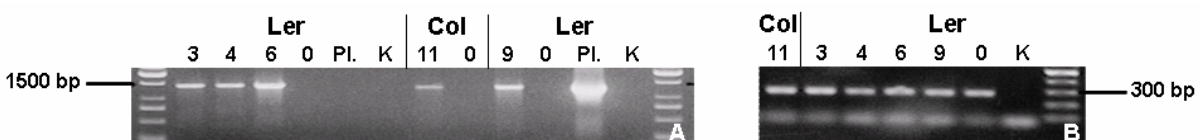


Abb. 43: Wiederholung der PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten

**A:** mit Primern für das Alliinasegen, erwartete Banden: A1 (Alliinase): 1340 bp, A1+TS2 (Alliinase+Signalsequenz): 1460 bp; **B:** mit GAPDH-spezifischen Primern, erwartete Bande: 300 bp; 0 = Wildtyp-DNA, Pl. = Plasmid als Positiv-Kontrolle, K = Wasser-Kontrolle

Durch diese Wiederholung der Untersuchungen mit neu isolierter genomischer DNA konnten in beiden PCR bei allen getesteten Linien Fragmente in den erwarteten Größen amplifiziert werden. Auch in diesem Fall konnten mit der PCR mit Alliinase-Primern keine Banden beim Einsatz von Wildtyp-DNA erzeugt werden, wohingegen in der Kontroll-PCR eine Bande in der erwarteten Höhe zu verzeichnen war.

#### 4.5.2.3 Expressionsanalyse

Nach der Überprüfung des Einbaus des Alliinasegens in das Genom der selektierten Pflanzen sollte getestet werden, ob das Gen auch abgelesen, d.h. die Alliinase in den Fremd-Pflanzen produziert wurde. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden zum Nachweis der mRNA verwendet.

##### **Nachweis der Expression des Alliinasegens mittels RT-PCR**

Aus den Transformanten wurde RNA aufgereinigt (3.9.1.4), in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription, RT) und in eine PCR mit den Alliinase-spezifischen Primern (Tab. 3) eingesetzt. Als Kontrolle diente cDNA aus Knoblauch, das zur Transformation verwendete Plasmid, cDNA aus Wildtyp-Pflanzen und Wasser. Um auch bei diesem Versuch sicherzustellen, dass fehlende Banden nicht auf eine mangelhafte RNA-Isolation oder Probleme bei der cDNA-Synthese zurückzuführen sind, wurde parallel eine PCR mit Primern für die GAPDH durchgeführt (vgl. 4.5.2.2). Da bei cDNA im Gegensatz zur genomischen DNA sämtliche Introns fehlen, war beim Einsatz der GAPDH-Primer statt einer 300 bp-Bande eine Bande etwa in der Höhe von 100 bp zu erwarten. Bei der PCR mit Alliinase-spezifischen Primern sollten weiterhin Fragmente mit 1340 bp (Al) bzw. 1460 bp (Al+TS2) amplifiziert werden. Abbildungen 44 und 45 zeigen die Bandenmuster der im Anschluss an die RT-PCR durchgeführten Gelelektrophoresen.

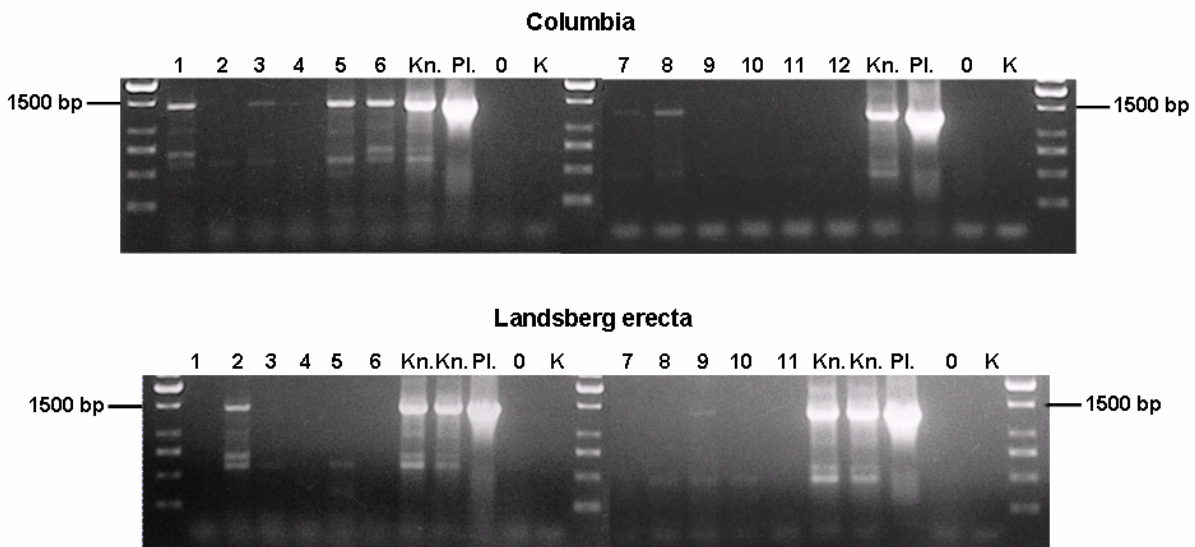


Abb. 44: RT-PCR mit RNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und Alliinase-spezifischen Primern

erwartete Banden: Al (Alliinase): 1340 bp, Al+TS2 (Alliinase+Signalsequenz): 1460 bp;  
 Kn. = Knoblauch-RNA, Pl. = Plasmid als Positiv-Kontrolle, K = Wasser-Kontrolle,  
 0 = Wildtyp-RNA

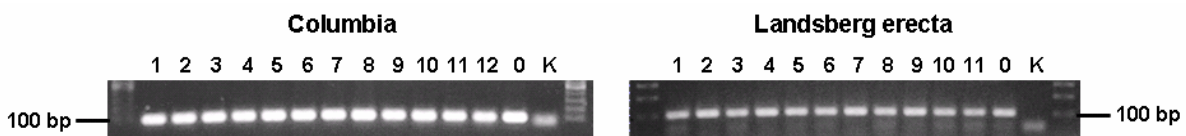


Abb. 45: RT-PCR mit RNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und GAPDH-spezifischen Primern

erwartete Bande: 100 bp; 0 = Wildtyp-DNA, K = Wasser-Kontrolle

Wie in Abbildung 44 zu sehen, konnten bei Transformanten des Ökotyps „Columbia“ in den Linien 1, 3, 5, 6, 7 und 8 Fragmente mit den erwarteten Größen von 1460 bp und 1340 bp nachgewiesen werden. Bei allen sechs Linien waren jedoch auch zusätzliche kleinere Banden zu erkennen. Die RT-PCR mit RNA der Linien 2, 4, 10 und 11 erbrachten lediglich die kleineren Banden. Unter den Transformanten des Ökotyps „Landsberg erecta“ zeigten nur die Linien 2 und 9 eine Bande in der erwarteten Höhe, wobei beide Linien auch kleinere Fragmente aufwiesen. Darüber hinaus konnten Fragmente mit einer geringeren als der erwarteten Größe bei den Linien 3, 4, 5, 8 und 10 festgestellt werden. Bei der RT-PCR mit RNA aus Wildtyp-Pflanzen und Alliinase-spezifischen Primern konnte bei keinem der beiden Ökotypen ein Amplifikat nachgewiesen werden. In der Kontroll-PCR mit GAPDH-Primern wiesen alle Linien sowie die Wildtyp-Pflanzen beider Ökotypen das erwartete Fragment mit einer Größe von 100 bp auf (siehe Abb. 45).

### Nachweis der Expression des Alliinasegens mittels Northern Blot-Analyse

Als zweite Methode zum Nachweis der Alliinase-RNA in den transgenen Pflanzen wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt (siehe 3.9.5). In Abbildung 46 sind die erzielten Ergebnisse dargestellt, wobei jeweils im oberen Teil ein Bild des Röntgenfilms des Northern Blots gezeigt wird, bei dem die Expression des Alliinasegens durch die Hybridisierung mit einer Alliinase-spezifischen RNA-Sonde (siehe 3.9.5.1 und Anhang 1) nachgewiesen werden sollte. Im unteren Teil ist das Foto des dazugehörigen Gels zu sehen, in dem die RNA durch Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht worden war.

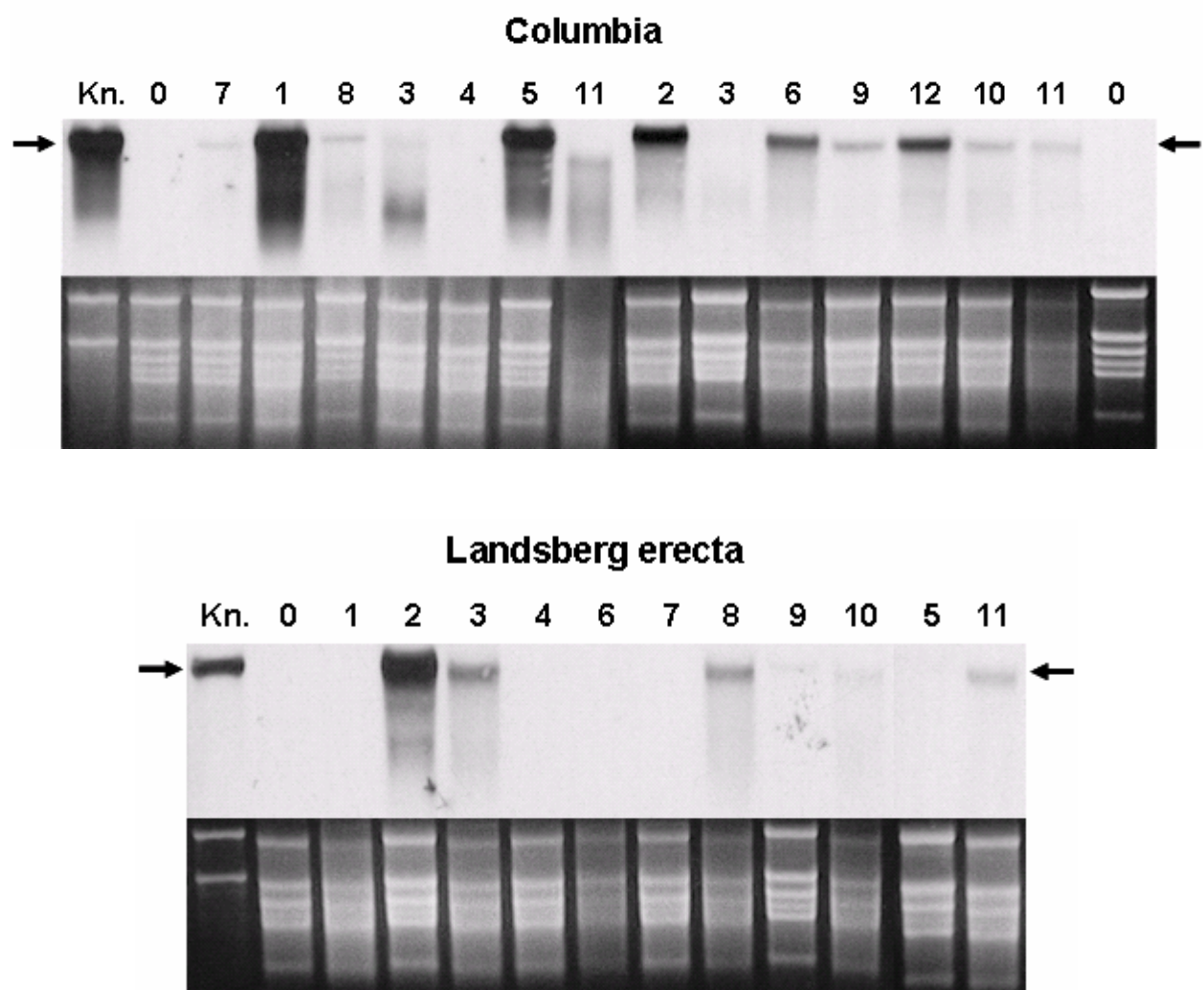


Abb. 46: Northern Blot-Analyse von homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten

Im oberen Teil der Abbildungen sind die Blots dargestellt, bei denen die Alliinase-RNA mit einer DIG-markierten Alliinase-spezifischen RNA-Sonde markiert wurden (siehe Anhang 1). Im unteren Teil ist das entsprechende Agarosegel zu sehen, bei dem die RNA mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Kn. = Knoblauch-RNA, 0 = Wildtyp-RNA

Unter den Transformanten des Ökotyps „Columbia“ zeigten die Linien 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11 und 12 eine Bande in der gleichen Höhe wie die RNA aus Knoblauch (siehe Pfeile). Die Bande der Linie 3 fiel allerdings sehr schwach aus und es war eine zusätzliche kleinere Bande zu erkennen. Im Wildtyp konnte mit der Alliinase-Sonde kein Fragment detektiert werden. Bei „Landsberg erecta“ konnte in den Linien 2, 3, 8, 9, 10 und 11 eine Bande auf der Höhe der Knoblauch-Bande (siehe Pfeile) nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich im Wildtyp keine Bande.

### Zusammenfassung der Expressionsanalysen

Columbia				Landsberg erecta			
Linien-Bezeichnung	gen. DNA	RT-PCR	Northern Blot	Linien-Bezeichnung	gen. DNA	RT-PCR	Northern Blot
Al+TS2 12.1 6/14	+	+	+	Al+TS2 3.2 3/14	-	-	-
Al+TS2 3.2 6/1	+	(+)	+	Al+TS2 12.1 9/11	+	+	+
Al+TS2 12.1 3/9	+	+	+/-	Al+TS2 3.2 1/2	+	(+)	+
Al+TS2 3.2 10/1	+	(+)	-	Al+TS2 12.1 2/10	+	(+)	-
Al+TS2 3.2 6/9	+	+	+	Al+TS2 12.1 6/12	+	(+)	-
Al+TS2 12.1 10/6	+	+	+	Al+TS2 12.1 7/6	+	-	-

Columbia				Landsberg erecta			
Linien-Bezeichnung	gen. DNA	RT-PCR	Northern Blot	Linien-Bezeichnung	gen. DNA	RT-PCR	Northern Blot
Al 1.4 1/3	+	+	+	Al 6.3 6/7	+	-	-
Al 6.3 4/15	+	+	+	Al 6.3 14/6	+	(+)	+
Al 1.4 2/5	+	-	+	Al 1.4 1/5	+	+	+
Al 6.3 2/11	+	(+)	+	Al 6.3 5/13	-	(+)	+
Al 6.3 10/9	+	(+)	+	Al 1.4 8/12	+	-	+
Al 1.4 15/8	+	-	+				

Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen homozygoter Alliinase-Transformanten (*A. thaliana*)

+ = positiv, - = negativ, (+) = zu kleine Bande(n), +/- = sehr schwache Bande

#### 4.5.2.4 Untersuchungen zur Klärung des Auftretens unerwarteter Banden bei der RT-PCR mit RNA aus transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Um das Zustandekommen der zusätzlichen kleinen Banden in der RT-PCR aufzuklären, sollten diese amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die Abfolge der Arbeitsschritte ist in Abbildung 47 anhand von Fotos der angefertigten Agarosegele dokumentiert. So wurde zunächst mit cDNA der beiden „Landsberg erecta“ Linien 2 und 5 eine PCR mit Alliinase-spezifischen Primern durchgeführt. Dabei konnten in Linie 5 lediglich die kleineren Zusatzfragmente amplifiziert werden. Linie 2 erbrachte darüber hinaus auch die für das Alliinasegen erwartete 1460 bp-Bande. Nachdem die in der Abbildung markierten Banden ausgeschnitten und aufgereinigt worden waren, wurde eine zweite PCR mit denselben Primern durchgeführt, um, wie im zweiten Foto zu sehen, die Banden zu verstärken. Zuletzt wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung (SeqLab, Göttingen) geschickt. Das dritte Foto zeigt die aufgereinigten Banden mit Größen von etwa 200 bp, 400 bp und 600 bp.

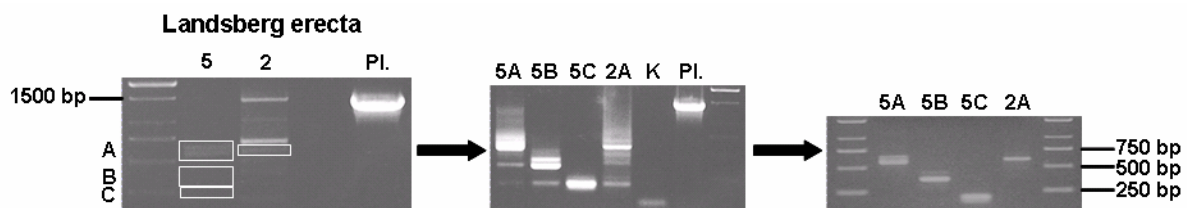


Abb. 47: Gelfotos der Arbeitsschritte zur Klärung der Entstehung von zusätzlichen Banden in der RT-PCR mit RNA transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Sequenzierung der Fragmente und der anschließende Vergleich mit der Alliinase-Sequenz zeigten, dass es sich bei allen vier Banden um Teilstücke des Alliinasegens handelte. Die Sequenzübereinstimmungen sind in der folgenden Abbildung markiert.

```

1 aattaattag ctatggtgga gtcttacaaa aaaattggca gttgtaataa aatgccatgc
61 ctagtgattt tgacatgcat tatcatgtct aattcatttg ttaacaataa taatatggtt
121 caagcgaaga tgacatggac tatgaaggca gcagaagagg cagaggcggg ggctaataa
181 gactgttcag agcatggaag agcttttctg gatggaatta ttcggaggg ctctcctaaa
241 tgcgagtgca acacttgcta caccgggtccg gattgctctg aaaagatcca aggttgctct
301 gctgatgttg ccagcgggta cggactgttc ctagaggaat actggaagca gcacaaggaa
361 gccagtgcag tgctggtttc accatggcac agaatgagct actttttcaa cccagtcagc
421 aatttcatat ctttcgagct tgaaaaaaca attaaagaac tacacgaggt agtgggaaat
481 gctgctgcaa aggacaggta cattgtgttt ggagtagggg tcaactcaact catccatgga
541 ctcgctcatct ctctttcacc aaatatgact gccactcccg acgcaccgga atctaaagtt
601 gttgctcatg ccccttttta tccggtgttc agagaacaaa caaaatattt tgacaagaaa
661 ggatacgtgt gggccgaaa tgcagccaat tacgtgaacg tttcaaacc agagcagtat
721 attgagatgg ttacttcacc taataacccc gaaggtctgc ttcgccatgc agtaatcaag
781 ggatgcaaat ccatttacga tatggtttac tactggcctc attacacccc aatcaagtac
841 aaagccgatg aagatatctt gctgtttaca atgtctaaat tcaactggga ctctggtagt
901 cgatttgggt gggcgttgat aaaggatgaa tctgtgtata ataacttgtt gaattacatg
961 acaaagaaca cagaggcac gccgcgtgaa acacaactac gatcgcctcaa agttctaaag
1021 gaagttgtag caatggtgaa aacgcagaaa ggcaccatgc gtgacctcaa cacattcggg
1081 tttaagaaac taaggagag atgggtcaat atcactgcac tactcgatca gtccgacaga
1141 ttctcctatc aagagcttcc tcaaagcgaa tactgcaatt acttcagaag aatgagacct
1201 ccatccccat cttatgcatg ggtgaagtgt gaatgggaag aagacaaaga ttgctaccag
1261 acatttcaga atggacgtat caacacacaa aatggagtgg gttttgaagc tagcagtcgt
1321 tacgtgcggt tgagtttgat caagacacag gatgattttg atcaactcat gtactattg
1381 aaggatatgg ttaaagcaaa gaggaagact cctctcatca aacaactttt cattgatcag
1441 accgagacgg cctcccgtcg tcctttcatt taagtactcg tgtcatgtat ttctctgctg
1501 ttttgtagt gtacgacat gctcatacat cctaattgta cggcagtaag gagtatcttt
1561 ctatgaaata aataaagtat gacattgtat cggtgctat atgattttgt aataaaatat
1621 gcattttcat gtttgaacat ttcattgtat attacaacaa tgcatcagat tacaagaata
1681 tacagagtat aatgaatat tacacagaaa tatcagagat ttaaattaca tttaaataca
1741 tgcagcggga aaataatata atacacaact agaagtatag atacggatac aaagctttcc
1801 ggatatcatt ccagctgtaa accaggatcc tgtgaatata aatctgcaaa accaaaacta
1861 ctagatatag ctatcctagc tccacggctc tccatttgca gaagtcttca tcctatcgca
1921 tcttcg

```

Abb. 48: Alliinase-Sequenz (cDNA)

Markiert sind die Sequenzen der Zusatzbanden, die bei der RT-PCR mit RNA aus transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen amplifiziert wurden. Fett: Start- und Stop-Codon (Alliinase + putative Signalsequenz (TS2)), grün: 600 bp-Fragment (aus Linie 2 und 5), blau: 400 bp-Fragment, unterstrichen: 200 bp-Fragment

Des Weiteren sollte geklärt werden, aus welchem Grund Linien, die in der RT-PCR nur die kleineren Banden gezeigt hatten, im Northern Blot positive Ergebnisse erbrachten. Dazu sollte getestet werden, ob die kürzeren Fragmente in der PCR synthetisiert werden, wenn Sequenzstücke am 3'-Ende der Alliinase-Sequenz fehlen. Eine solche Sequenzverkürzung könnte auch beim Einbau des Gens in das Genom der *Arabidopsis*-Pflanzen aufgetreten sein. Beträfe dies nicht den Sequenzbereich der Sonde (Basen 229 – 761 der Alliinase-cDNA), so würde diese immer noch hybridisieren. Aus diesem Grund sollte die PCR mit der kompletten Alliinase-Sequenz und zwei verkürzten Fragmenten sowohl mit den Primern, die zur Synthese der gesamten Alliinase-Sequenz und in der RT-PCR eingesetzt worden waren, als auch mit dem Primer-Paar der Sondenherstellung durchgeführt werden. Zur Verkürzung wurde die Alliinase-Sequenz mit *NheI* und *SalI* aus dem Vektor pGEM-TEasy, in den das Gen kloniert worden war,

herausgeschnitten. Dabei wurden etwa 160 bp am 3'-Ende des Gens entfernt. Als Kontrollen dienten die ungekürzte Alliinase-Sequenz, wie sie mit *EcoRI* aus dem Vektor geschnitten werden konnte, und das entsprechende Plasmid. Abbildung 49 stellt das Ergebnis dieser PCR dar, wobei die Proben 1 – 3 mit Primern zur Synthese der gesamten Alliinase-Sequenz amplifiziert wurden und Proben 4 – 6 mit den Sonden-Primern. 1 und 4 resultierten aus dem ungekürzten Fragment, 2 und 5 aus dem gekürzten Fragment und 3 und 6 aus dem Plasmid.

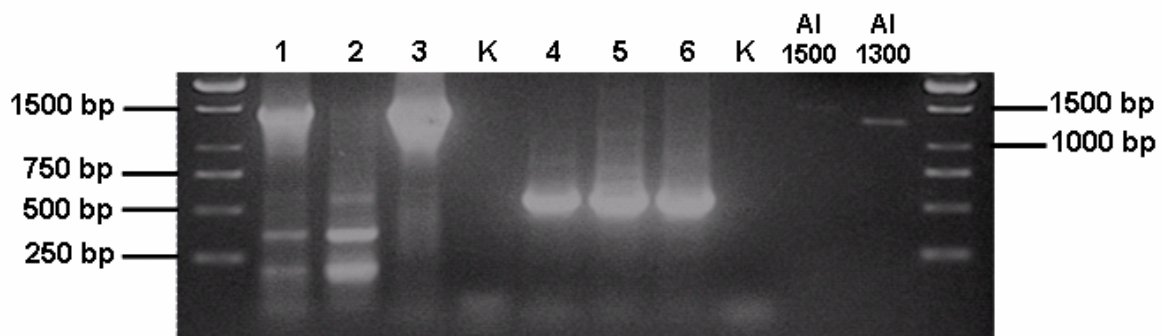


Abb. 49: PCR mit gekürzter und ungekürzter Alliinase-Sequenz zur Klärung der positiven Northern Blot-Ergebnisse von Linien, die in der RT-PCR zu kleine Banden erbracht hatten

1-3 = mit Primern zur Synthese des Alliinasegens, 4-6 = mit Primern zur Synthese der Alliinase-Sonde, 1+4 = ungekürzte Sequenz, 2+5 = gekürzte Sequenz, 3+6 = Plasmid mit Alliinasegen, K = Wasser-Kontrolle, Al 1500 = ungekürztes Fragment (mit *EcoRI* aus Plasmid geschnitten), Al 1300 = gekürztes Fragment (mit *SalI* und *NheI* aus Plasmid geschnitten)

Die PCR mit der ungekürzten Sequenz und den Primern zur Synthese der gesamten Alliinase-Sequenz erbrachte die erwartete Bande von 1460 bp und drei kleinere, aber auch schwächere Banden bei 200, 400 und 600 bp. In der Probe, bei der die gekürzte Sequenz mit denselben Primern kombiniert worden war, waren nur die Banden in der Höhe von 200, 400 und 600 bp zu sehen, wobei die beiden kleineren deutlich stärker waren als die 600 bp-Bande. Das Plasmid ergab die Bande der gesamten Alliinase-Sequenz (1460 bp). Mit den Primern, die zur Herstellung der RNA-Sonde konstruiert worden waren, konnte mit allen drei DNAs das erwartete Fragment mit 530 bp amplifiziert werden. Die Kontrolle der aufgereinigten Fragmente (Al 1500 und Al 1300) zeigte eine klare Verkürzung des Fragments durch eine Restriktion mit *NheI* und *SalI*.

#### 4.5.2.5 Überprüfung der Alliinase-Aktivität in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen

Für die Untersuchung der Alliinase-Aktivität wurden lediglich diejenigen Linien ausgewählt, die in allen drei vorherigen Analysen ein positives Ergebnis erbracht hatten (vgl. Tab. 15). Mit Hilfe des unter 3.10.5.1 beschriebenen Assays konnten in Proteinextrakten der selektierten Linien die in den Abbildungen 50 und 51 gezeigten Aktivitäten gemessen werden. Die spezifische Aktivität ist in  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  angegeben, da bei der durchgeführten Methode die

Alliinase-Aktivität indirekt über die Abnahme des NADH ermittelt wird. Das bei der Alliinase-katalysierten Reaktion vom Alliin zum Allicin entstehende Pyruvat wird von der Lactat-Dehydrogenase, die dem Reaktionsgemisch zugegeben wurde, unter NADH-Verbrauch in Lactat umgewandelt. Dabei ist der NADH-Verbrauch direkt proportional zum Alliin-Umsatz und erlaubt somit eine Aussage zur Geschwindigkeit der Alliinase-Reaktion.

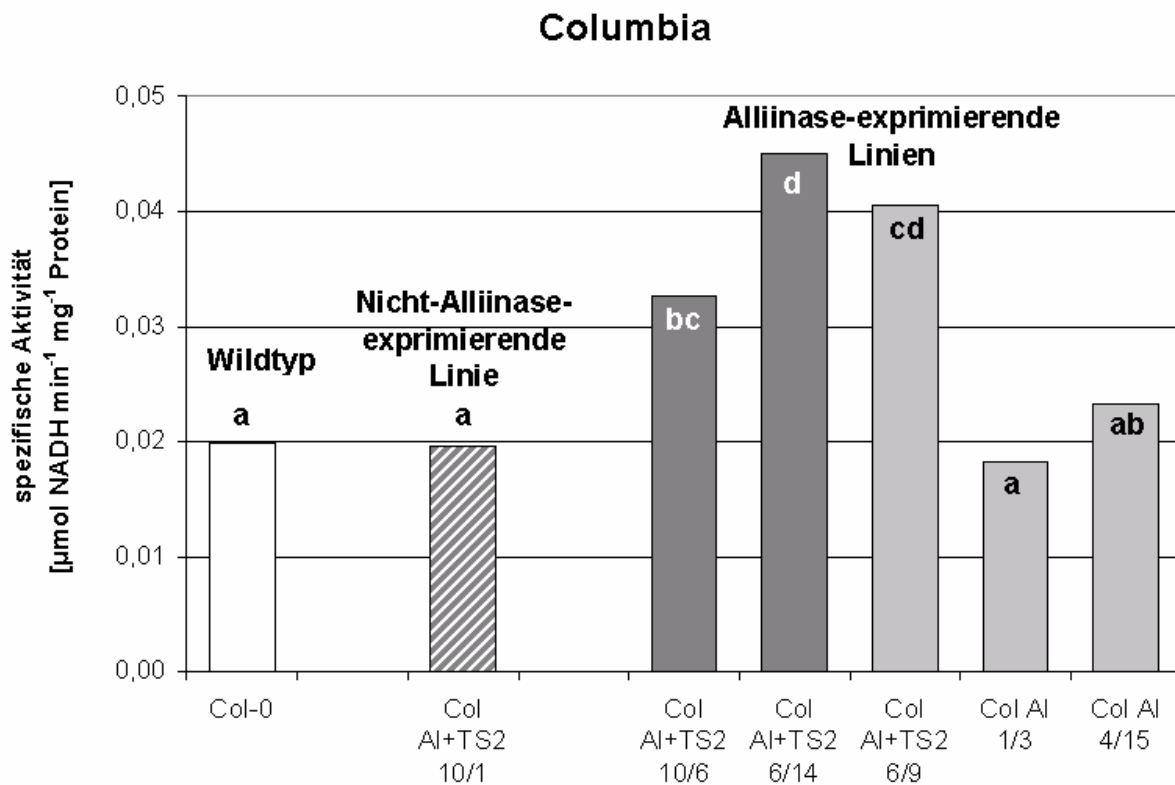


Abb. 50: Alliinase-Aktivität in homozygoten Transformanten des Ökotyps „Columbia“ im Vergleich zum Wildtyp und einer Linie, welche nach RNA-Analyse keine Alliinase-Expression zeigte. Signifikante Unterschiede sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Sowohl die „Columbia“-Wildtyp-Pflanzen als auch die Linie, welche nach den Expressionsanalysen keine Knoblauch-Alliinase produzierte, zeigten eine Hintergrund-Aktivität von etwa  $0,02 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$ . Eine ähnliche Alliinase-Aktivität konnte auch bei den Linien AI 1/3 und AI 4/15 gemessen werden. Im Gegensatz dazu lies sich bei den anderen drei Transformanten des Ökotyps „Columbia“ eine deutlich höhere Aktivität feststellen. So wurde für die Linie AI+TS2 10/6 eine Umsatzrate von  $0,033 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$ , für AI+TS2 6/9 von  $0,041 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  und für die Linie AI+TS2 6/14 sogar von  $0,045 \mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  gemessen. Die Steigerung der Aktivität erwies sich im Vergleich zu den Kontrollen und den beiden Linien AI 1/3 und AI 4/15 als signifikant (Abb. 50).

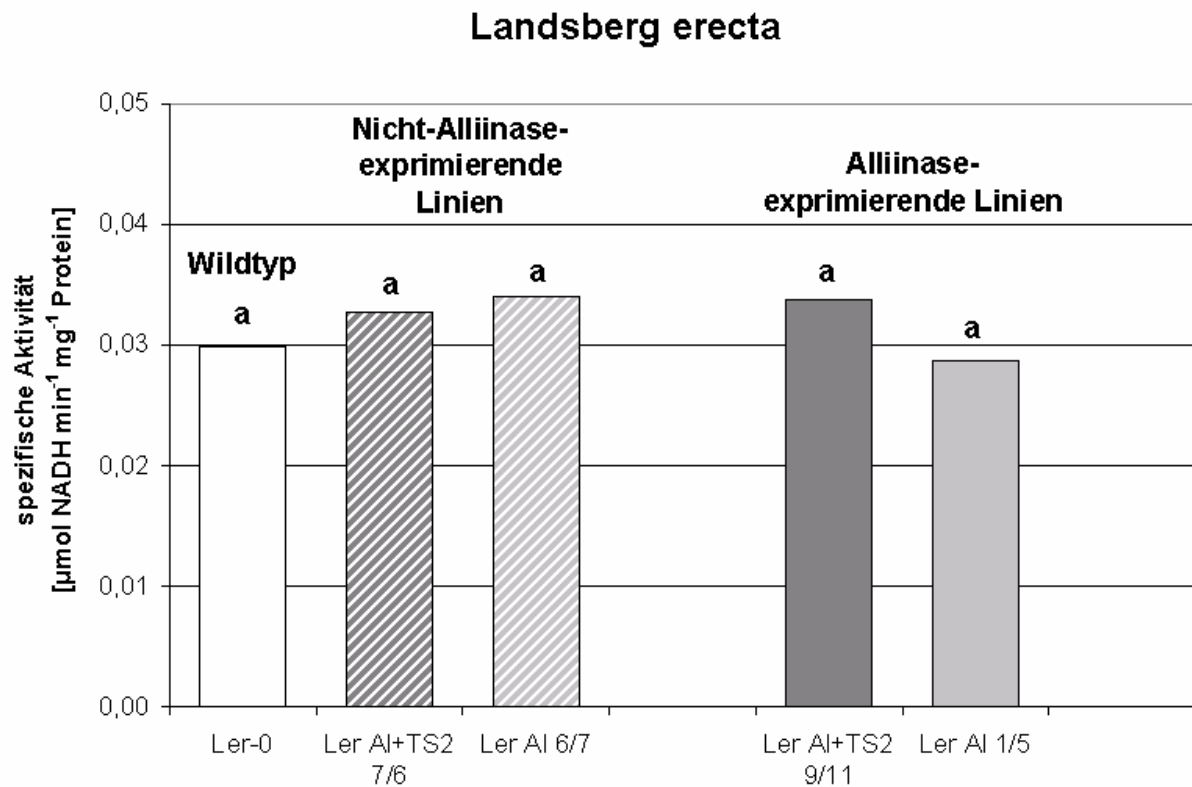


Abb. 51: Alliinase-Aktivität in homozygoten Transformanten des Ökotyps „Landsberg erecta“ im Vergleich zum Wildtyp und zwei Linien, welche nach RNA-Analyse keine Alliinase-Expression zeigten

Signifikante Unterschiede sind durch Beschriftung der Säulen mit verschiedenen Buchstaben markiert (Tukey-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die Alliinase-Aktivität bei den „Landsberg erecta“-Pflanzen lag sowohl beim Wildtyp als auch bei den beiden Linien, die nach den RNA-Analysen keine Alliinase-Expression zeigten, mit 0,03 bis 0,034  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  deutlich über den Negativ-Kontrollen des Ökotyps „Columbia“. Auch unterschied sich keine der Alliinase-exprimierenden Linien in ihrer Aktivität signifikant von den Kontrollen. So konnte in Proteinextrakten von Pflanzen der Linie AI+TS2 9/11 eine Umsatzrate von 0,034  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  und bei AI 1/5 von ca. 0,29  $\mu\text{mol NADH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$  gemessen werden.

## 4.6 Studien zur Lokalisation der Alliinase

In der Literatur wurde lediglich für die Alliinase aus Zwiebel beschrieben, dass diese in Vakuolen der Zellen lokalisiert werden konnte (LANCASTER & COLLIN, 1981). Für Knoblauch wurde jedoch lediglich gezeigt, in welchen Zellarten sich die Alliinase befindet (ELLMORE & FELDBERG, 1994; YAMAZAKI *et al.*, 2002). Die subzelluläre Lokalisation wurde für Knoblauch bisher noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund sollten die molekularbiologischen Studien zur

Alliinase aus Knoblauch in der vorliegenden Arbeit auf die Lokalisation des Proteins ausgeweitet werden. Dies sollte auch eine Vorhersage ermöglichen, wo das Enzym in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zu erwarten sei. Zur Untersuchung der Alliinase-Lokalisation sollten zwei Reportergene, das für die  $\alpha$ -Amylase codierende Gen und das des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP), mit möglichen Signalsequenzen der Alliinase fusioniert werden.

#### 4.6.1 Transiente Expression einer Fusion putativer Alliinase-Signal-sequenzen und des $\alpha$ -Amylasegens aus Gerste in Tabak-Protoplasten

Die Literaturrecherche und Sequenzanalysen mit Computer-Programmen zur Vorhersage möglicher Signalsequenzen erbrachten mehrere Sequenzen, die für die Lokalisation der Alliinase verantwortlich sein könnten. So wurden zunächst drei putative Signalsequenzen mittels assembly PCR (3.9.3.3) an das Gen der  $\alpha$ -Amylase aus Gerste gekoppelt und in einen Pflanzen-Expressionsvektor (pAMY) kloniert (siehe Abb. 52). Mit den Vektoren konnten dann Tabak-Protoplasten transformiert (3.9.3.9) und die Amylase-Aktivität im Medium sowie in den Zellen bestimmt werden (3.10.5.2). Dies sollte einen Hinweis auf den Verbleib des Enzyms geben. Bei den drei Sequenzen handelte es sich um eine kurze Signalsequenz (TS-K), die auf der von RABINKOV *et al.* (1994) veröffentlichten cDNA-Sequenz beruhte, eine längere Signalsequenz (TS-L), ausgehend von der cDNA-Sequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992) und der um 30 bp (10 Aminosäuren) verlängerten Signalsequenz ebenfalls nach VAN DAMME *et al.*. Die genauen Sequenzen sind den Anhängen 1 und 2 zu entnehmen.

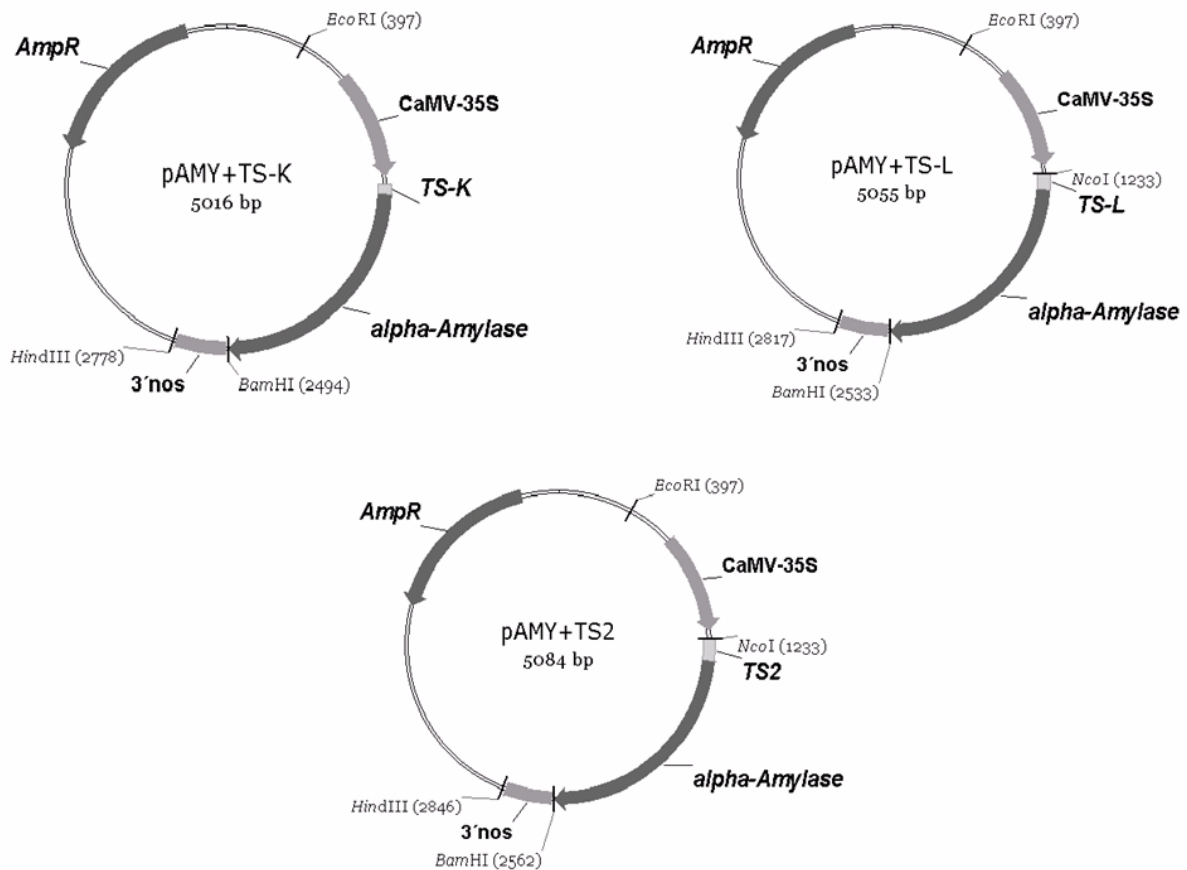


Abb. 52: Plasmidkarten der pAMY-Vektoren, die für Lokalisationsstudien in Tabak-Protoplasten transformiert wurden

TS-K = mögliche Signalsequenz nach RABINKOV *et al.* (1994), TS-L = mögliche Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992), TS2 = um 30 bp (10 Aminosäuren) verlängerte Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992), CaMV-35S = Promotor, 3'nos = Terminator

In ersten Versuchen konnten die in Tabelle 16 aufgelisteten Amylase-Aktivitäten gemessen werden.

Plasmid	Aktivität im Medium [ $\Delta\text{OD}_{405} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]	Aktivität in Zellen [ $\Delta\text{OD}_{405} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]
pAMY	3,84	1,00
pAMY+TS-K	-0,04	0,00
pAMY+TS-L	0,18	0,02
pAMY+TS2	1,68	0,38

Tab. 16: Relative Aktivitäten der  $\alpha$ -Amylase im Medium und in Tabak-Protoplasten nach Transformation mit Konstrukten, welche die reine  $\alpha$ -Amylase-Sequenz bzw. eine an verschiedene mögliche Signalsequenzen gekoppelte  $\alpha$ -Amylase-Sequenz enthielten

pAMY = mit endogener Signalsequenz, pAMY+TS-K = mit möglichen Signalsequenz nach RABINKOV *et al.* (1994), pAMY+TS-L = mit möglichen Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992), pAMY+TS2 = mit um 30 bp (10 Aminosäuren) verlängerten Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992)

Bei der Fusion mit TS2, wie auch bei der unveränderten  $\alpha$ -Amylase, konnte in Medium und Zellen eine deutliche Aktivität nachgewiesen werden. Bei beiden lag die Aktivität im Medium klar über der in den Zellen. Im Gegensatz dazu war bei den Fusionen mit TS-K und TS-L sowohl im Medium als auch in den Zellen keine bzw. eine äußerst geringe  $\alpha$ -Amylase-Aktivität zu messen. Aus diesem Grund wurden für weitere Tests nur das Kontroll-Plasmid und pAMY+TS2 verwendet.

Sowohl die Droge Wortmannin als auch ein Konstrukt des vakuolären Sorting-Rezeptors BP80, bei dem die Ligandenbindestelle durch GFP ersetzt wurde (BP80-GFP), haben einen Einfluss auf vakuoläre Sortierungssequenzen. Beide unterbinden den vakuolären Transport und führen so zur Sekretion des Proteins (DASILVA *et al.*, 2005; s.a. Kapitel 1.4.1). Deshalb sollte durch Zugabe von 33  $\mu$ M Wortmannin nach der Transformation bzw. durch Co-Transformation mit BP80-GFP deren Wirkung auf die putative Signalsequenz der Alliinase untersucht werden. Das BP80-GFP-Konstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Prof. J. Denecke (Universität Leeds) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente zunächst die unveränderte, sekretierte  $\alpha$ -Amylase. Nach der Ermittlung der durchschnittlichen  $\alpha$ -Amylase-Aktivität im Medium und in den Zellen konnte mit der folgenden Formel der sekretorische Index (SI) berechnet werden (PHILLIPSON *et al.*, 2001). Dieser gibt an, wie stark ein Protein sekretiert wird.

$$SI = \frac{\text{spezif. Aktivität im Medium } [\Delta OD_{405} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}]}{\text{spezif. Aktivität in den Zellen } [\Delta OD_{405} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}]}$$

In Abbildung 53 ist die Änderung des sekretorischen Indexes beider  $\alpha$ -Amylase-Konstrukte durch die Zugabe von Wortmannin bzw. die Co-Transformation mit BP80-GFP dargestellt.

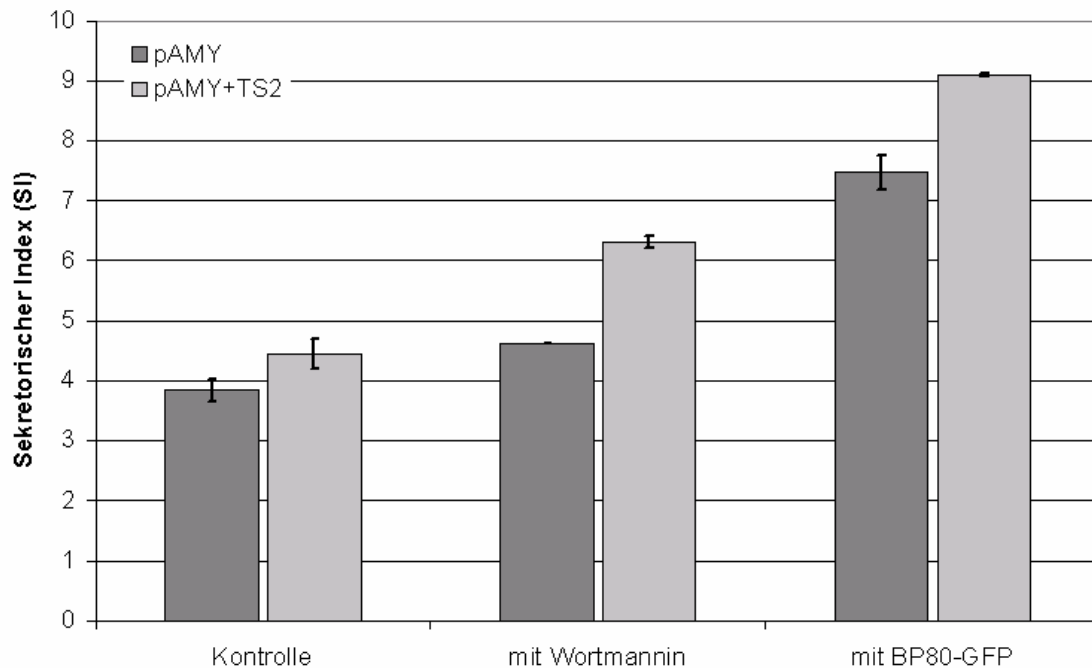


Abb. 53:  $\alpha$ -Amylase-Sekretion in Tabak-Protoplasten nach Zugabe von 33  $\mu$ M Wortmannin nach der Transformation bzw. bei Co-Transformation mit einem Konstrukt des vakuolären Sorting-Rezeptors BP80, dessen Ligandenbindestelle durch GFP ersetzt wurde (BP80-GFP)

pAMY = unveränderte  $\alpha$ -Amylase, pAMY+TS2 = an die putative Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelte  $\alpha$ -Amylase; die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar.

Die an die Signalsequenz der Alliinase gebundene Amylase zeigte insgesamt einen etwas höheren sekretorischen Index als die unveränderte  $\alpha$ -Amylase. So erbrachte pAMY+TS2 in der Kontrollvariante einen SI von 4,5, wohingegen der SI der  $\alpha$ -Amylase mit ihrem endogenen Sortierungssignal unter 4 lag. Durch eine Zugabe von 33  $\mu$ M Wortmannin veränderte sich die Sekretion in beiden Fällen nur wenig. Der SI von pAMY wurde auf 4,6 angehoben, was einem Faktor 1,15 entspricht, und der SI von pAMY+TS2 auf 6,3 (Faktor 1,4). Im Vergleich dazu fiel die Veränderung des sekretorischen Indexes durch eine Co-Expression mit BP80-GFP geringfügig stärker aus. Hier steigerte sich der SI von pAMY von 3,8 auf 7,5, also um einen Faktor von 1,97. Auch der SI von pAMY+TS2 wurde verdoppelt. Er stieg von 4,5 auf 9,1 (Faktor 2,02).

Um die Wirkung des Sorting-Rezeptors BP80 (BP80-GFP) genauer zu untersuchen, sollten in einer weiteren Versuchsreihe Tabak-Protoplasten mit pAMY+TS2 und verschiedenen Konzentrationen des BP80-GFP-Plasmids co-transformiert werden. Auf diese Weise sollte die Konzentrationsabhängigkeit des Einflusses des BP80-GFP auf die Signalsequenz der Alliinase getestet werden. Zum Vergleich wurden weitere Tabak-Protoplasten mit einem Plasmid, das die

$\alpha$ -Amylase mit dem vakuolären Sortierungssignal des Sporamins aus Süßkartoffeln beinhaltetete (pAMY+Sporamin), transformiert. Auch hier wurden verschiedene Mengen des BP80-GFP-Plasmids hinzugegeben. In beiden Fällen wurde die extra- und intrazelluläre  $\alpha$ -Amylase-Aktivität gemessen und mit der oben angegebenen Formel der sekretorische Index berechnet (Ergebnisse siehe Abb. 54 A und B).

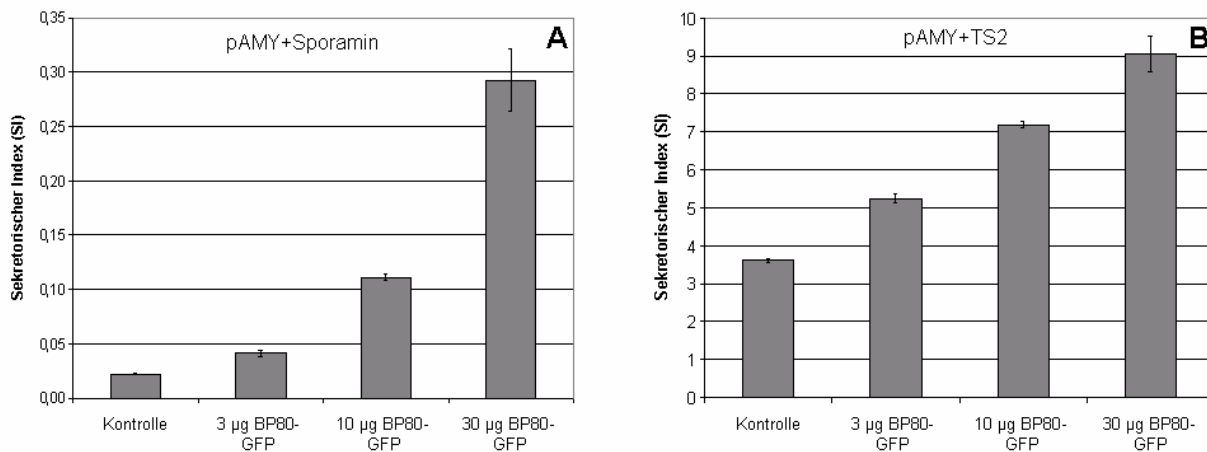


Abb. 54:  $\alpha$ -Amylase-Sekretion in Tabak-Protoplasten bei Co-Transformation mit verschiedenen Mengen eines BP80-Konstrukts, bei dem die Ligandenbindestelle durch GFP ersetzt wurde (BP80-GFP)

**A:** an das vakuoläre Sortierungssignal des Sporamins gekoppelte  $\alpha$ -Amylase, **B:** an die putative Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelte  $\alpha$ -Amylase; die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die ermittelten Standardabweichungen dar

Ein Vergleich der Sekretion der Amylase ohne BP80-GFP und mit 30  $\mu$ g des Plasmids zeigte im Fall des Sporamin-Sortierungssignal eine Erhöhung des sekretorischen Indexes von 0,02 auf 0,29, also um einen Faktor von 14,5. Im Gegensatz dazu konnte im Versuch mit der  $\alpha$ -Amylase gebunden an die mögliche Alliinase-Signalsequenz nur ein Anstieg des SI von 3,6 auf 9,0 verzeichnet werden. Dies entspricht einem Faktor von 2,5.

#### 4.6.2 Transiente Expression einer Fusion der putativen Alliinase-Signalsequenz und des GFP-Gens (Grün-fluoreszierendes Protein)

Zur Visualisierung wurde die ausgewählte Signalsequenz (TS2) mittels assembly PCR (3.9.3.3) an das Gen des grün-fluoreszierenden Proteins gekoppelt und in einen Vektor zur Expression in Pflanzenzellen kloniert (pGFP+TS2; Abb. 55). Dies sollte die Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie ermöglichen.

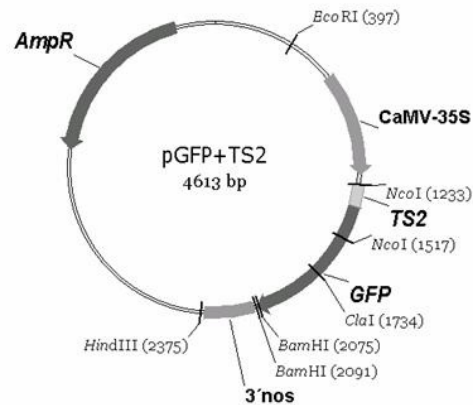


Abb. 55: Plasmidkarte des pGFP-Vektors, der für Lokalisationsstudien in Tabak-Protoplasten transformiert wurde

TS2 = um 30 bp (10 Aminosäuren) verlängerte Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992),  
CaMV-35S = Promotor, 3'nos = Terminator

#### 4.6.2.1 Expression in Tabak-Protoplasten

Zunächst wurde auch dieses Plasmid in Tabak-Protoplasten eingebracht. Nachdem die Protoplasten zur Synthese des GFPs über Nacht inkubiert worden waren, konnten die in den Abbildung 56 und 57 gezeigten Bilder mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Firma Zeiss) aufgenommen werden. Als Kontrolle diente ein Vektor, der das Gen für das grün-fluoreszierende Protein ohne Fusion an eine fremde Signalsequenz trug (pEMERALD).

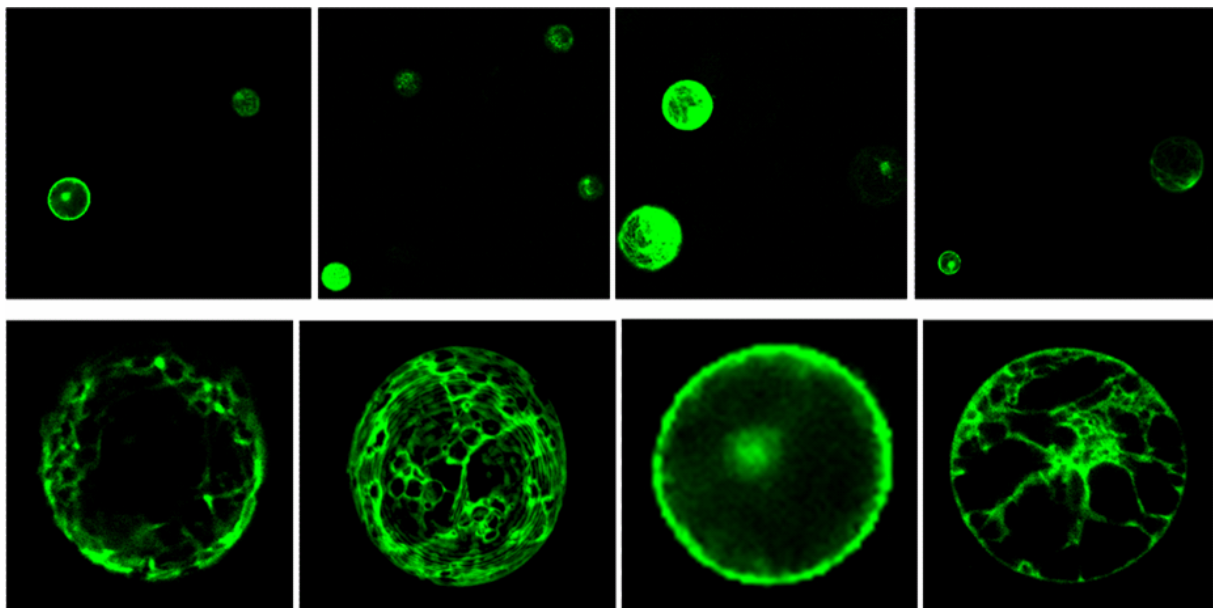


Abb. 56: Expression des fusionsfreien GFPs in Tabak-Protoplasten (pEMERALD)

Aufnahmen mit konfokalem Laser-Scan-Mikroskop (Anregung: 488 nm,  
Emission: 500-550 nm, Vergrößerung: 400- bzw. 1000-fach)

Bei den mit pEMERALD transformierten Protoplasten konnte eine deutliche Expression des GFP-Gens im Cytosol nachgewiesen werden. Auf den Bildern deutlich zu erkennen, die grün fluoreszierenden Cytoplasmastränge, die sich durch den gesamten Protoplasten erstrecken. Darüber hinaus war auch der Zellkern stark gefärbt.

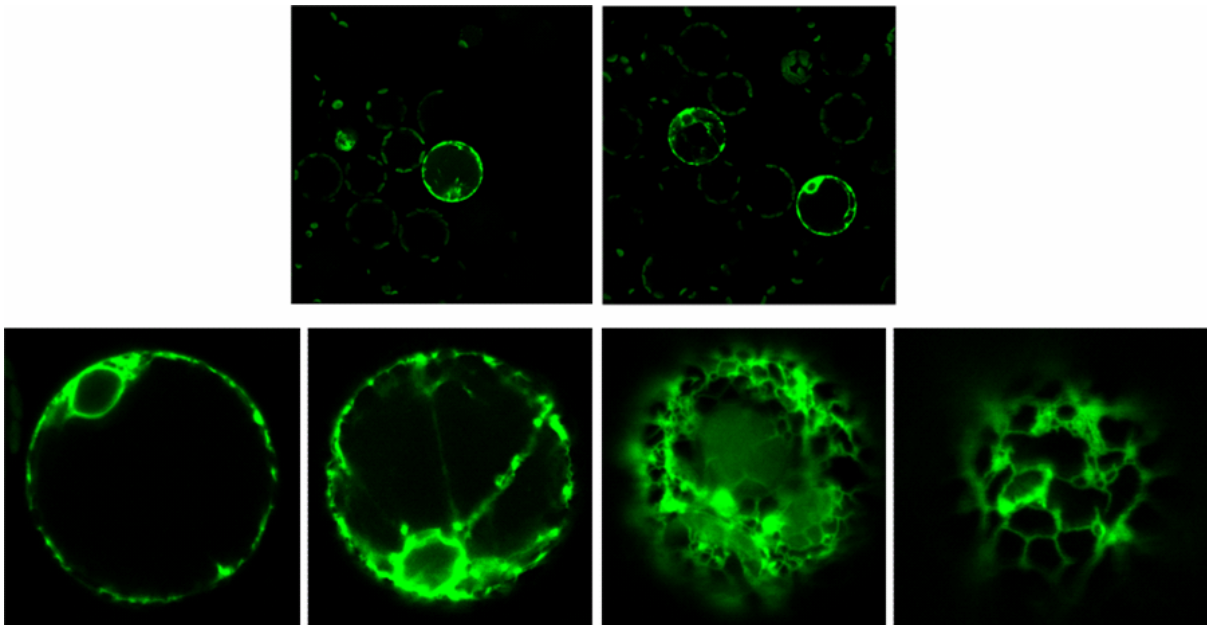


Abb. 57: Expression des an die Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelten GFP-Gens in Tabak-Protoplasten (pGFP+TS2)

Aufnahmen mit konfokalem Laser-Scan-Mikroskop (Anregung: 488 nm, Emission: 500-550 nm, Vergrößerung: 400- bzw. 1000-fach)

Auch mit dem GFP+TS2-Konstrukt konnte eine gute GFP-Expression in Tabak-Protoplasten erzielt werden. Die hier erkennbaren Stränge zogen sich zwar ebenfalls durch die gesamte Zelle, wirkten aber im Vergleich zu denen des fusionsfreien GFPs weniger diffus. Darüber hinaus waren punktförmige Strukturen im Bereich dieser Stränge zu erkennen. Ein weiterer Unterschied zum „Wildtyp“-GFP bestand darin, dass der Zellkern nicht vollständig gefärbt erschien, sondern lediglich ein ihn umgebender Zirkel grün fluoreszierte, der mit der Kernhülle, die mit dem ER in Verbindung steht, übereinstimmen könnte. Eine Färbung der zentralen Vakuole war nicht zu beobachten.

#### 4.6.3 Expression in Epidermiszellen der Zwiebel (*Allium cepa*)

Um festzustellen, ob das GFP bei einer Fusion mit der Alliinase-Signalsequenz in Zellen von *Allium*-Gewächsen anders lokalisiert ist als in Tabakzellen, wurden beide Vektoren (pGFP+TS2 und pEMERALD) mittels „Particle Bombardment“ in Epidermiszellen der Zwiebel (*Allium*

*cepa*) eingebracht (3.9.3). Nach der Inkubation über Nacht konnten die folgenden Aufnahmen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM R) angefertigt werden.

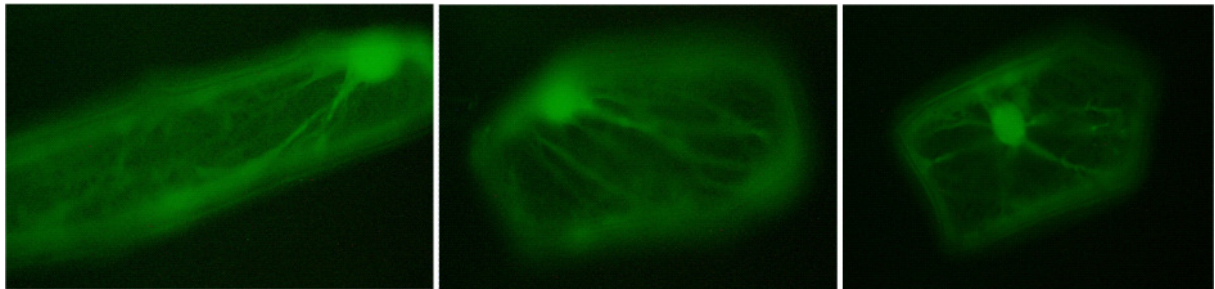


Abb. 58: Expression des fusionsfreien GFP-Gens in Zwiebelepidermiszellen (pEMERALD)

Aufnahmen mit Fluoreszenz-Mikroskop (Anregung: 490 nm, Emission: 510 nm, Vergrößerung: 400-fach)

Auch bei der Expression des GFPs ohne Signalsequenz in Epidermiszellen der Zwiebel waren die Cytoplasmastränge deutlich durch ihre grüne Fluoreszenz zu erkennen. Ebenfalls stark gefärbt erschien auch bei diesen Zellen der Zellkern.

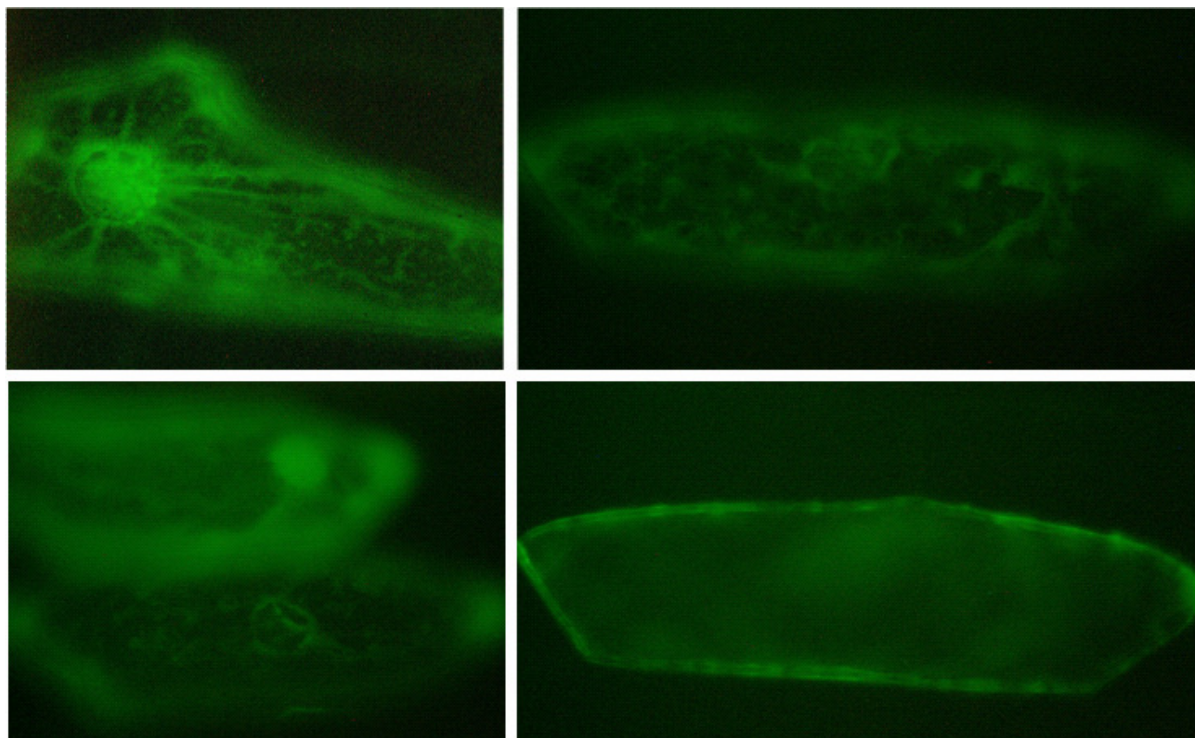


Abb. 59: Expression des an die Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelten GFP-Gens in Zwiebelepidermiszellen (pGFP+TS2)

Aufnahmen mit Fluoreszenz-Mikroskop (Anregung: 490 nm, Emission: 510 nm, Vergrößerung: 400-fach)

Die Transformation der Zwiebelzellen mit pGFP+TS2 zeigte im Vergleich zur Expression in Tabak-Protoplasten keinen klaren Unterschied. Auch hier waren Stränge zu sehen, die sich durch die gesamte Zelle erstreckten und verglichen mit denen des unveränderten GFPs weniger diffus erschienen. Die in Protoplasten beobachteten punktförmigen Strukturen im Bereich der Stränge zeigten sich auch in den Epidermiszellen der Zwiebel. Deutlich zu erkennen war auch das grün fluoreszierende, den Zellkern umhüllende Netzwerk. Des Weiteren konnte auch in Zwiebelepidermiszellen keine Färbung der zentralen Vakuole beobachtet werden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Etablierung eines Analyseverfahrens zur Bestimmung des Allicingehalts in Knoblauchsaff

Mit der spektrophotometrischen Methode nach HAN *et al.* (1995) konnte der Allicingehalt von Knoblauchsaff nur recht ungenau abgeschätzt werden, da die Konzentration sämtlicher im Saft vorkommender Thiosulfinate bestimmt wurde. Folglich lies auch der von CURTIS *et al.* (2004) beschriebene und zu Beginn der vorliegenden Arbeit verwendete *E. coli*-Bioassay nur eine Schätzung der Allicinmenge im verwendeten Knoblauchsaff zu, da er mit Hilfe der spektrophotometrischen Methode kalibriert wurde. Im Gegensatz dazu konnte mit der, aufbauend auf den Angaben von KREST (2000), entwickelten HPLC-Methode das Allicin im Knoblauch durch die Integration der Peakfläche wesentlich präziser berechnet werden. Dies ermöglichte auch eine präzisere Aussage über den im Bioassay ermittelten Allicingehalt des Knoblauchsaffes. Bei dem Vergleich des Spektrums des als Allicin identifizierten Peaks der Knoblauchprobe mit dem eines Allicin-Standards, verliefen beide Kurven fast identisch (siehe Abb. 14, Kapitel 4.1.1). Somit konnte gezeigt werden, dass das Allicin mit Hilfe der Retentionszeit durch das verwendete Computer-Programm korrekt identifiziert werden konnte. Die Aufnahme des Spektrums ermöglichte darüber hinaus eine manuelle Peak-Identifikation im Falle einer Änderung der Retentionszeit, z.B. durch Druckschwankungen, die mehrfach durch variierende Raumtemperaturen vorkamen. Darüber hinaus gab die Verwendung eines internen Standards die Möglichkeit, die Probenaufbereitung zu kontrollieren und einen eventuellen Verlust von Allicin, z.B. während der Filtration, zu bemerken. Durch die etablierte Methode der HPLC konnte das im Knoblauchsaff enthaltene Allicin also zuverlässig und ohne Verfälschung des Ergebnisses durch andere Thiosulfinate quantifiziert werden. Dies ermöglichte auch ein genaueres Einstellen einer bestimmten Allicin-Konzentration in Versuchen zur Wirkung oder dem Wirkmechanismus des Knoblauchsaffes. Des Weiteren machte die Kalibration des *E. coli*-Bioassays mit HPLC-Daten es möglich, den Allicin-Gehalt der Proben, die im Vorfeld der Etablierung der HPLC-Methode bereits in Tests verwendet worden waren, nachträglich genauer zu bestimmen (siehe Abb. 15, Kapitel 4.1.2). Durch die Kalibration des Bioassays mittels HPLC-Daten, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, steht auch anderen Arbeitsgruppen mit dem Bioassay eine Methode zur zuverlässigen Quantifizierung des Allicins zur Verfügung, auch wenn keine HPLC genutzt werden kann (SLUSARENKO *et al.*, 2008).

## 5.2 Vergleich der Wirksamkeit von in Knoblauchsft enthaltenem und reinem Allicin im Bioassay

In der Literatur werden neben dem Allicin auch andere Inhaltsstoffe des Knoblauchs mit einer antimikrobiellen Wirkung erwähnt. So wird für das Ajoen zusätzlich zur antithrombotischen Wirkung (BLOCK *et al.*, 1984) auch eine antifungale Wirkung beschrieben (YOSHIDA, 1987; SINGH & CHAUHAN, 1992; REIMERS *et al.*, 1993; NAGANAWA *et al.*, 1996). Da das Allicin jedoch mengenmäßig der Hauptinhaltsstoff des Knoblauchssaftes ist (ALI *et al.*, 2000), ist anzunehmen, dass auch die antimikrobielle Wirkung hauptsächlich auf diese Substanz zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, wurde reines Allicin im *E. coli*-Bioassay getestet, der zuvor mit Knoblauchsft durchgeführt und mittels HPLC kalibriert worden war (siehe Kapitel 4.1.2 und 5.1). Nach HPLC-Analyse waren in der eingesetzten Lösung  $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$  Allicin enthalten. Im durchgeführten Bioassay ergab sich eine Hemmhofgröße, die laut der Kalibrationsgeraden des Bioassays und der zugehörigen Gleichung, einer Allicin-Konzentration des eingesetzten Standards von  $1,52 \text{ mg ml}^{-1}$  entsprach (vgl. Kapitel 4.2). Unter Beachtung der biologischen Schwankungen des Bioassays und der Ungenauigkeiten bei der Messung der Hemmhofdurchmesser, ist die geringe Abweichung um nur 5% von der per HPLC ermittelten Konzentration ein Hinweis darauf, dass die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs tatsächlich dem Allicin zuzuschreiben ist, wie es bereits 1944 von CAVALLITO & BAILEY postuliert wurde. Des Weiteren zeigten diese Ergebnisse, dass die Kalibration des Bioassays mit Hilfe der HPLC-Daten für eine zuverlässige nachträgliche Berechnung der Allicin-Konzentrationen in den Knoblauchsaften, die für einige vorher durchgeführte Untersuchungen verwendet worden waren, genutzt werden konnte. Auch eine Verwendung des Bioassays als alleinige Methode zur Bestimmung von Allicin-Konzentrationen, falls keine HPLC zur Verfügung steht, erwies sich durch dieses Ergebnis als durchaus zuverlässig.

## 5.3 Untersuchungen zur Wirkung von Knoblauchsft gegen phytopathogene Organismen

Versuche mit verschiedenen Pathosystemen sollten Aufschluss darüber geben, ob Knoblauchsft auch *in planta* wirksam ist. Darüber hinaus sollte das Potential des Knoblauchs für verschiedene Anwendungsmöglichkeiten untersucht werden.

## Blattkrankheiten

Bei den Blattkrankheiten wurde das Hauptaugenmerk in den entsprechenden Versuchen auf das Pathosystem *Phytophthora infestans* / *Solanum lycopersicum* L. gelegt. In ersten Versuchen sollte eine effektive Knoblauchsftverdünnung zur Bekämpfung des Oomyceten ermittelt werden. Da der erwähnte Bioassay gezeigt hatte, dass die Wirksamkeit des Knoblauchsftes höchstwahrscheinlich auf das Allicin zurückzuführen ist, sollte auch die zur Kontrolle des Pathogens notwendige Allicin-Konzentration bestimmt werden. Die Versuche ergaben, dass eine Wirkung zwischen 80 und 100% mit Knoblauchsftverdünnungen von 1:50 bis 1:85 erreicht werden kann (siehe Abb. 16, Kapitel 4.3.1.1). Verdünnte man den Saft 1:100 war die Wirksamkeit des Saftes gegen *P. infestans* an Tomate deutlich reduziert und wies keinen signifikanten Unterschied zu Wasser-Kontrolle mehr auf. Den wirksamen Verdünnungen entsprachen Allicin-Konzentrationen von 65 bis 110  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Ein Vergleich der ermittelten Werte mit solchen, die in der Literatur gefunden werden konnten, fällt schwer, da in keinem der dort beschriebenen Versuche Knoblauchsft gegen *Phytophthora infestans* eingesetzt wurde (MENON, 1994; ARYA *et al.*, 1995; OBAGWU & KORSTEN, 2003). In allen drei Fällen wurden Knoblauchzehen zu einem Brei zerstoßen, in Wasser homogenisiert und in dieser Form als Rohextrakt eingesetzt. Durch die Zugabe des Wassers wurde der Knoblauchpresssaft also bereits während der Herstellung verdünnt. Allerdings kann aufgrund des Vorhandenseins der festen Bestandteile der Zehen keine genaue Angabe über den Verdünnungsfaktor des eigentlichen Saftes gemacht werden. Auch die Allicin-Konzentration wurde in keinem der beschriebenen Versuche ermittelt. Beides macht einen Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen schwierig. In weiteren Ansätzen gaben alle genannten Autoren dem „Knoblauchmus“ noch Lösungsmittel hinzu, was einen Vergleich mit den hier vorgestellten Daten unmöglich macht. Um dennoch eine, wenn auch ungenaue, Vergleichsmöglichkeit zu haben, wurde die im Folgenden beschriebene Beobachtung für eine Schätzung des Verdünnungsfaktors des von MENON (1994) verwendeten Knoblauchextraktes herangezogen. Bei der Herstellung des Saftes nach der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode erhielt man etwa 1/3 des Frischgewichtes als Saft, wenn man das Gewicht und das Volumen gleichsetzte. Aus 10 g Knoblauchzehen bekam man also etwa 3 ml Saft. Ginge man nun davon aus, dass die von MENON eingesetzten 500 g Knoblauch etwa 170 ml Saft beinhalteten, führte die Zugabe von 500 ml Wasser während der Aufarbeitung zu einer Verdünnung des Saftes von etwa 1:3. In den von MENON beschriebenen Versuchen zur Bekämpfung von *Claviceps sorghum* an Hirse wurde demnach eine deutlich höhere Knoblauchkonzentration eingesetzt als in den eigenen Versuchen mit *Phytophthora infestans* an Tomate. Daher erscheint es auch nicht

verwunderlich, dass in den Hirse-Versuchen eine 100%-ige Wirksamkeit festgestellt werden konnte.

Würde man die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung des Knoblauchs, wie sie in eigenen Arbeiten festgestellt wurde (siehe Abb. 16, Kapitel 4.3.1.1), als Kurve darstellen, so ergäbe sich ein sigmoider Kurvenverlauf. Dies ist laut BLAESER *et al.* (2002) typisch für fungizide Substanzen und wurde auch bereits bei anderen biologisch aktiven Wirkstoffen beobachtet. Durch die deutliche Korrelation zwischen applizierter Knoblauch- bzw. Allicin-Konzentration und der Befallsreduktion kann eine Aussage über die optimale Dosis des Wirkstoffes getroffen werden (MICHEL *et al.*, 1999). Für eine Bekämpfung des Oomyceten *P. infestans* an Tomate und damit für weitere Versuche zur Untersuchung eines möglichen Einsatzes von Knoblauchsft als Pflanzenschutzmittel konnte demnach 1:50 verdünnter Knoblauchsft verwendet werden. Die eingesetzte Allicin-Konzentration sollte nicht unter  $65 \mu\text{g ml}^{-1}$  liegen.

Nach BLAESER *et al.* (2002) kann auch die Applikationstechnik zur Wirkstoffaufnahme beitragen. So wäre auch eine Aufnahme des Allicins über die Wurzeln und ein Transport innerhalb der Pflanze denkbar. Dies würde bedeuten, dass der Knoblauchsft oder zumindest das Allicin systemisch wirkt. Versuche, in denen eine Gieß- oder Wurzelapplikation mit einer Sprühapplikation verglichen wurde, zeigten, dass bei der Gießapplikation Knoblauchsftverdünnungen mit deutlich höheren Allicin-Konzentration benötigt wurden, um eine mit der Sprühapplikation vergleichbare Reduktion des Befalls von Tomatenpflanzen mit *P. infestans* zu erhalten (siehe Abb. 17, Kapitel 4.3.1.2). Es zeigte sich bei der Gießapplikation kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den Konzentrationen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Wirkung nicht auf einer Wirkstoffaufnahme und dem Transport innerhalb der Pflanze beruht sondern auf der schon von CURTIS *et al.* (2004) beschriebenen Gasphasenwirkung. Ein Stoff geht solange von der flüssigen in die Gasphase über, bis sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Phasen eingestellt hat, also der Sättigungsdampfdruck erreicht ist, welcher von verschiedenen Parametern, wie der Temperatur und der Konzentration des Stoffes abhängig ist (ATKINS, 2002). Bis zu dem Zeitpunkt, wo sich das erwähnte Gleichgewicht eingestellt hat, geht der Stoff in gleichen Mengen in die Gasphase über, unabhängig von seiner Konzentration (NISING, pers. Mitteilung). Im beschriebenen Versuch wurde vermutlich dieses Gleichgewicht nie erreicht, da das gasförmige Allicin durch die im umgebenden Raum befindliche Luft stetig verdünnt wurde. Somit wurde stets die gleiche Menge Allicin freigesetzt, unabhängig von der Konzentration im Knoblauchsft. Zur Bekämpfung des

Oomyceten stand demzufolge immer dieselbe Allicin-Konzentration zur Verfügung, was die fehlende Abhängigkeit der Wirksamkeit von der im Saft vorliegenden Allicin-Konzentration erklären würde. Somit wäre die Gasphasenwirkung und nicht die systemische Verteilung innerhalb der Pflanze als Ursache für die Hemmung der Infektion anzusehen. Tatsächlich konnten auch BLAESER *et al.* (2002) in ihren Versuchen keinen Transport des Extraktes innerhalb der Pflanzen feststellen. Zur genauen Klärung, ob eine Systemizität vorliegt, müsste eine Reihe weiterer Untersuchungen durchgeführt werden. Bei der Sprühapplikation bestätigten sich die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe. So zeigte eine Allicin-Konzentration von  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  lediglich eine Wirksamkeit von 60%. Ab einer Konzentration von  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin lag die Wirkung, wie schon in den ersten Versuchen, über 90%.

Bei der Untersuchung von Wirkstoffen sollten neben der optimalen Konzentration auch die Wirkungsweise und die Wirkdauer betrachtet werden. Dies gibt Hinweise auf den späteren Applikationszeitpunkt und die notwendige Behandlungshäufigkeit (HOFFMANN *et al.*, 1994). Wirkt eine Substanz nach der Infektion und verhindert die Ausbreitung des Pathogens im pflanzlichen Gewebe spricht man von einer *kurativen* Wirkungsweise. Im Gegensatz dazu spricht man von einer *protektiven* Wirkung, wenn eine Behandlung vor der Inokulation zur Kontrolle des Pilzes führt (KAST, 2005). Der verwendete Knoblauchsaff wies in Versuchen mit dem Pathosystem *Phytophthora infestans* / *Solanum lycopersicum* bei einer Anwendung einen Tag nach der Inokulation bereits einen Verlust seiner Wirksamkeit gegen den Oomyceten auf (siehe Abb. 18, Kapitel 4.3.1.3). Eine Behandlung 1 bzw. 2 Tage vor der Inokulation führte zwar zu einer etwas stärkeren Reduktion des Befalls, jedoch lag auch diese Wirkung unter 40%. Dies zeigt, dass es sich beim Knoblauchsaff auf keinen Fall um eine kurative Wirkungsweise handelt. Da die Wirkung jedoch bereits bei einem Abstand von einem Tag zwischen Applikation und Infektion schon deutlich abnimmt, kann auch nicht von einer protektiven Wirkung gesprochen werden. Die Wirkung des Allicins kann eher mit der eines wenig persistenten Kontakt-Fungizids verglichen werden (PORTZ *et al.*, 2008). Dies resultiert vermutlich aus der Flüchtigkeit und der hohen Reaktionsfreudigkeit des Allicins (BLOCK, 1992). Die Behandlung sollte demnach möglichst zeitnah zum Infektionsereignis durchgeführt werden. Versuche in denen die Veränderung der Wirksamkeit des Knoblauchsaffes im Verlauf von 10 Tagen nach einer einmaligen, zum Infektionsereignis zeitnah durchgeführten Behandlung untersucht wurden, zeigten eine nicht-signifikante Reduktion der Wirksamkeit 7 Tage nach Inokulation im Vergleich zur Wirksamkeit 4 Tage nach Inokulation. Nach 10 Tagen war die Abnahme der Wirkung jedoch soweit fortgeschritten, dass sie signifikant unterschiedlich zur Effektivität vier Tage nach

Inokulation war (siehe Abb. 19, Kapitel 4.3.1.4). Die Entwicklung des Oomyceten konnte also durch die Applikation der Knoblauchsftverdünnung etwa um eine Woche verschoben werden (PORTZ *et al.*, 2008). Wird die Behandlung zeitnah zur Infektion durchgeführt, ist demnach eine weitere Behandlung etwa eine Woche später zu empfehlen, um die Ausbreitung des Erregers zu verhindern.

Da es sich beim Allicin um eine flüchtige Verbindung handelt (BLOCK, 1992), war zu befürchten, dass sich die Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Größe des die Pflanzen umgebenden Raumes verändert. So besteht die Möglichkeit, dass sich das Allicin bei einer Vergrößerung des Raumes schneller verflüchtigt und dementsprechend kürzer zur Abwehr des Pilzes zur Verfügung steht. Zur Aufrechterhaltung der für die Infektion notwendigen hohen Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen in den bisher beschriebenen Versuchen während der gesamten Dauer des Experiments unter Hauben gehalten. In Versuchen, bei denen die Inkubationshauben bereits einen Tag nach der Inokulation entfernt wurden, konnte keine signifikante Veränderung der Wirksamkeit des Knoblauchsftes beobachtet werden (siehe Abb. 20, Kapitel 4.3.1.5). Die Wirkung des Knoblauchsftes gegen Oomyceten ist also unabhängig von der Raumgröße. Wäre dies nicht der Fall, wäre ein Einsatz des Knoblauchsftes im Pflanzenschutz unmöglich.

Ein weiteres Ausschlusskriterium für ein Mittel, das zur Behandlung von Pflanzen eingesetzt werden soll, sind pflanzenschädigende Nebenwirkungen (UESUGI, 1998). Deshalb wurde auch eine mögliche Phytotoxizität des Knoblauchsftes untersucht. Obwohl deutlich höhere Allicin-Konzentrationen und damit geringere Verdünnungen des Knoblauchsftes eingesetzt wurden, konnten nur äußerst geringe Schädigungen der Pflanzen festgestellt werden (siehe Tab. 9, Kapitel 4.3.1.6). Erst bei einer Applikation von  $800 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin konnten minimale Schäden (Phytotox-Klasse 2  $\rightarrow$  max. 2,5% der Blattfläche der gesamten Pflanze geschädigt (GOROG NEE PRIVITZER *et al.*, 1988) beobachtet werden. Eine deutliche phytotoxische Wirkung des Knoblauchsftes liegt demnach nicht vor, so dass eine Anwendung im Pflanzenschutz diesbezüglich als unbedenklich angesehen werden kann (PORTZ *et al.*, 2008). Dies gilt insbesondere bei einer Applikation im Gewächshaus, denn dort dürfte bereits eine Allicin-Konzentration von  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  ausreichend sein, um eine Infektion von Tomatenpflanzen mit *P. infestans* zu verhindern. Die Anwendung einer höheren Konzentration erscheint unnötig, da dort ähnlich wie in den, in der vorliegenden Arbeit genutzten Klimakammern, die Wirkung des Knoblauchs nicht durch Umweltfaktoren (z.B. Regen) negativ beeinflusst werden kann.

Nachdem die bisher beschriebenen Versuchsergebnisse eine Anwendung des Knoblauchsafte zur Behandlung von Pflanzen, um diese vor einem *P. infestans*-Befall zu schützen, möglich erscheinen ließen, sollte der Einfluss einer Formulierung des Saftes auf seine Wirksamkeit gegen *Phytophthora infestans* untersucht werden. Formulierungen werden bei Pflanzenschutzmitteln verwendet, um die Eigenschaften der Wirkstoffe zu optimieren. Sie können aber auch einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit einer Substanz haben. Für die genannten Untersuchungen wurde der Knoblauchsaft in Kapseln mit unterschiedlicher Zusammensetzung eingeschlossen. Dies könnte zur Stabilisierung des Allicins und zu einer verzögerten Freisetzung, einem sogenannten „slow-release“ Effekt führen. Auf diese Weise könnte die Wirkdauer des Knoblauchsafte verlängert werden. Darüber hinaus würde eine Verkapselung des Saftes eine weitere Applikationsmethode ermöglichen. So könnte eine Bodenbehandlung durchgeführt werden, bei der die Kapseln entweder auf den Boden unterhalb der Pflanzen gestreut oder in die Erde eingearbeitet würden. Eine solche Behandlungsmethode scheint besonders für die Anwendung im Gewächshaus interessant zu sein, da es hier unproblematisch ist, die Kapseln dem Substrat beizumischen. Eine Verkapselung konnte bereits erfolgreich zur Stabilisierung und Etablierung von Biopestiziden im Boden verwendet werden (PATEL *et al.*, 2004). In eigenen Versuchen mit in Alginat-Kapseln eingeschlossenem Knoblauchsaft konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des Saftes erhalten bleibt (siehe Abb. 21, Kapitel 4.3.1.7). Eine Menge von 1,5 g der Kapseln genügte, um eine 90% Wirksamkeit gegen *P. infestans* an Tomate zu erzielen. Die Leerformulierung hingegen wies keinerlei Wirkung auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Reduktion des Befalls tatsächlich auf den eingeschlossenen Knoblauchsaft zurückzuführen ist. In Tests mit 14 weiteren Kapseln unterschiedlicher Zusammensetzung konnte festgestellt werden, dass acht der Kapseln die Wirkung des Saftes ebenfalls aufrecht erhielten. Die anderen sechs Kapselzusammensetzungen erwiesen sich jedoch als unbrauchbar, da sie einen deutlich negativen Effekt auf die Wirksamkeit des Knoblauchsafte hatten. (Da die Versuche zur Formulierung des Knoblauchs in Zusammenarbeit mit der FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) durchgeführt wurden, kann aus Geheimhaltungsgründen nicht genauer auf die Zusammensetzung der einzelnen Kapseln eingegangen werden.) Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es möglich ist Knoblauchsaft in Kapseln einzuschließen, ohne dass er seine Wirkung gegen eine Infektion von Tomaten-Pflanzen mit *Phytophthora infestans* verliert. In Abhängigkeit von der Kapselzusammensetzung scheint es jedoch zu Unterschieden in der Freisetzungsrates und der Stabilisierung des Allicins zu kommen (SLUSARENKO *et al.*, 2008). Da es sich bei den verwendeten Formulierungen um biologisch abbaubare Kapseln handelte, sind die beschriebenen

positiven Ergebnisse besonders für den ökologischen Landbau interessant. Aufbauend auf diesen Ergebnissen könnte in weiteren Untersuchungen versucht werden, eine Kapselzusammensetzung zu finden, die die Wirkdauer des Saftes deutlich verlängert (*ibid.*). Im Anschluss daran wären Versuche zu Anwendungsmöglichkeiten denkbar, wie der bereits erwähnten Einbringung in das Substrat von Gewächshauskulturen.

Wichtig für den Einsatz von Naturstoffen im Pflanzenschutz ist auch ihre Wirkung im Freiland, wo neben verschiedenen Umweltfaktoren, wie Regen und Sonne, auch der andauernde Befallsdruck einen negativen Einfluss auf die Effektivität der Wirkstoffe haben kann. So beschreibt BRENNER (1993), dass sowohl die biologische Aktivität als auch die Stabilität von Naturstoffen im Freiland oft geringer ausfällt als im Gewächshaus. Im Gegensatz dazu konnten BLAESER *et al.* (2002) auch im Freiland eine deutliche Befallsreduktion durch eine Applikation von Pflanzenextrakten nachweisen. So führte die protektive Applikation eines Extraktes aus *Salvia officinalis* (Echter Salbei) im Freiland zur Unterdrückung einer *Phytophthora infestans*-Infektion an Tomate. In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Knoblauchsft gegen *P. infestans* an Kartoffel im Freiland untersucht werden. Dazu wurden Pflanzen mit zwei verschiedenen Verdünnungen des Saftes zu den praxisüblichen Behandlungsterminen besprüht. Da die Witterung während des Versuchs jedoch zu warm und trocken war, konnte in der unbehandelten Kontrolle nur eine befallene Blattfläche von durchschnittlich 3% bonitiert werden. Aus diesem Grund kann über die Wirksamkeit des Knoblauchsftes im Freiland keine Aussage gemacht werden. Nur mit  $600 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin im Saft konnte ein leicht reduzierter Befall der Kartoffelpflanzen festgestellt werden (siehe Abb. 23, Kapitel 4.3.2). Die Wirksamkeit lag jedoch unter 10%. Wäre es zu einem moderaten Befall des Kartoffelbestandes mit *P. infestans* gekommen, würde eine solch geringe Wirkung daraufhin deuten, dass eine Anwendung des Knoblauchsftes im Freiland nicht möglich ist. Aufgrund des geringen Befalls kann aber ohne eine Wiederholung des Versuchs unter besseren Infektionsbedingungen keine Einschätzung des Potentials von Knoblauchsft im Freiland vorgenommen werden. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die Symptome von *Phytophthora infestans* denen einer *Alternaria solani*-Infektion sehr ähnlich sind. Deshalb sollte auch eine Infektion der Kartoffelpflanzen mit *Alternaria solani*, dem Erreger der Dürffleckenkrankheit, nicht ausgeschlossen werden. Da zum Zeitpunkt des Freiland-Versuches noch keine Evaluierung der gegen diesen Pilz wirksamen Knoblauchsftverdünnung bzw. Allicin-Konzentration durchgeführt worden war, konnte keine Aussage dazu gemacht werden, ob die Wirksamkeit des Saftes im Freiland geringer ist als im Gewächshaus bzw. in Klimakammern. So bestand die Vermutung, dass eine Konzentration von

600  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin zur Kontrolle dieses Pilzes im Freiland nicht ausreichend sein könnte, weil er möglicherweise generell unempfindlicher gegenüber Knoblauchsft reagiert als *P. infestans*. Tatsächlich zeigte sich in späteren Klimakammer-Versuchen zur Wirksamkeit verschiedener Knoblauchsftverdünnungen gegen *Alternaria solani* an Tomate, in allen drei Varianten eine deutlich geringere Wirkung des Knoblauchsftes, als in vergleichbaren Varianten in Versuchen mit *Phytophthora infestans* (siehe Abb. 24, Kapitel 4.3.3). Um eine knapp 50%-ige Wirksamkeit zu erreichen, mussten die Pflanzen mit einer Knoblauchsftverdünnung behandelt werden, die einen Allicin-Gehalt von 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$  aufwies. Diese Wirksamkeit des Knoblauchs gegen *A. solani* entsprach etwa der Hälfte derer, die in Versuchen mit *P. infestans* ermittelt werden konnte (vgl. Abb. 16, Kapitel 4.3.1.1). *Alternaria solani* erwies sich demnach als deutlich weniger sensitiv gegenüber Knoblauch bzw. Allicin als *Phytophthora infestans*. Solche Unterschiede in der Sensitivität zwischen Erregern aus unterschiedlichen Pathogen-Spezies können im Pflanzenschutz immer wieder beobachtet werden. Aus diesem Grund existieren z.B. Wirkstoffe, die spezifisch zur Bekämpfung von Oomyceten eingesetzt werden, aber nicht gegen pilzliche Krankheitserreger. Sollte in den Freilandversuchen also eine *A. solani*-Infektion vorgelegen haben, wäre zur Unterdrückung dieses Befalls wahrscheinlich eine noch höhere Allicin-Konzentration notwendig gewesen. Die beiden eingesetzten Konzentrationen wurden basierend auf Klimakammer-Versuchen mit *Phytophthora infestans* ausgewählt, der deutlich empfindlicher auf die Behandlung mit Knoblauchsft reagiert. Die Tests zur Freilandanwendung des Knoblauchsftes sollten unter besseren Infektionsbedingungen wiederholt werden. Dabei könnte eventuell auch auf eine künstliche Inokulation zurückgegriffen werden, um sicherzustellen, dass auswertbare Daten erfasst werden können. Ein weiteres Ergebnis des Freilandversuches stellt die Untersuchung einer möglichen phytotoxischen Wirkung des Knoblauchsftes dar. Obwohl in Klimakammer-Versuchen kein solcher Effekt festgestellt werden konnte, wäre es dennoch denkbar, dass im Freiland durch die deutlich stärkere Lichteinstrahlung und / oder durch höhere Temperaturen eine Phytotoxizität zu beobachten wäre. Dies war in keiner der beiden Varianten der Fall. Diesbezüglich bleibt ein Einsatz des Knoblauchs im Pflanzenschutz also weiterhin unbedenklich.

Zusammenfassend für die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Knoblauchsft gegen Erreger von Blattkrankheiten kann festgehalten werden, dass für die Unterdrückung einer *P. infestans*-Infektion von Tomatenpflanzen in abgeschlossenen Räumen wie Klimakammern und Gewächshäusern, in denen die Wirksamkeit des Knoblauchsftes nicht durch Umweltfaktoren negativ beeinflusst wird, eine Allicin-Konzentration von 65-110  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ausreicht. Das

entspricht einer Verdünnung des frischen Knoblauchsafte von 1:50 bis 1:85. Im Gegensatz dazu wird für die Bekämpfung von *Alternaria solani* an Tomate unter denselben Bedingungen eine doppelt so hohe Allicin- bzw. Knoblauch-Konzentration benötigt. Der verwendete Knoblauchsft zeigte keine kurative Wirkung und auch die Wirksamkeit bei einer protektiven Anwendung fiel schwach aus. Für eine zufriedenstellende Kontrolle muss die Behandlung also möglichst zeitnah zum Infektionsereignis stattfinden. Nach einer Zeitspanne von 10 Tagen nach der Inokulation verliert der Saft deutlich an Wirkung und sollte spätestens zu diesem Zeitpunkt, besser jedoch schon nach einer Woche, erneut appliziert werden, um einen weiteren Schutz der Pflanze vor einer Infektion zu gewährleisten. Ein phytotoxischer Effekt des Knoblauchsafte konnte weder in Klimakammern noch im Freiland festgestellt werden, was den Einsatz des Knoblauchsafte zum Schutz von Pflanzen gegen Pathogene unbedenklich macht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Einschluss des Knoblauchsafte in verschiedenen zusammengesetzte Kapseln möglich ist, ohne den Verlust der Wirkung gegen *Phytophthora infestans*. Die Zusammensetzung der Kapseln und eine mögliche Anwendung wären in künftigen Versuchen zu optimieren. Bei einer mehrfachen Applikation kann Knoblauchsft eindeutig zur Kontrolle von Blattkrankheiten eingesetzt werden. Insbesondere die Anwendung in kleinerem Maßstab, wie z.B. im Gewächshaus oder Hobbygarten erscheint praktikabel, denn eine Herstellung des Saftes im industriellen Maßstab dürfte zu aufwendig und darüber hinaus ökonomisch nicht sinnvoll sein (SLUSARENKO *et al.*, 2008). Auch die Versorgung mit einer entsprechend großen Menge an Knoblauch könnte problematisch werden. Für eine Anwendung im konventionellen Landbau wäre die Verwendung des Allicins als mögliche Leitstruktur zur Entwicklung einer neuen Fungizid-Klasse, die auch eine Wirkung gegen Oomyceten aufweisen könnte, denkbar (*ibid.*).

### **Samenbürtige Krankheiten**

Ein weiteres Problem in der landwirtschaftlichen Produktion, insbesondere im ökologischen Landbau, stellen neben den Blattkrankheiten solche Erreger dar, die das Saatgut und die Keimlinge der Kulturpflanzen befallen. Zur Bekämpfung dieser samenbürtigen Krankheiten können sogenannte Beizmittel, die auf die Samen aufgebracht werden, genutzt werden. 2002 beschrieben BLAESER *et al.* eine keimhemmende Wirkung von Pflanzenextrakten auf Getreidesaatgut. Im Gegensatz dazu zeigten RUSSEL & MUSSA (1977), dass eine Saatgutbehandlung der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) mit Knoblauchsft den Befall mit *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, dem Erreger der Wurzelfäule, deutlich reduziert ohne die Samenkeimung zu unterdrücken. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die

Anzahl gesunder Keimlinge von Karottensamen, die einen natürlichen Befall mit *Alternaria dauci* und *Alternaria radicina* aufwiesen, durch eine Inkubation in verdünntem Knoblauchsafte gesteigert werden konnte. Bereits ein Quellen der Samen für eine Stunde im Saft führte zu einer Anzahl gesunder Keimlinge, die der entsprach, die durch eine praxisübliche und für den ökologischen Landbau zugelassene Beize, mit dem Wirkstoff Thiram, erreicht werden konnte (siehe Abb. 26, Kapitel 4.3.4.1). Die hierfür notwendige Allicin-Konzentration im Knoblauchsafte lag mit  $450 \mu\text{g ml}^{-1}$  deutlich über den für die Blattbehandlungen ermittelten Konzentrationen. Dies bestätigt die Beobachtung einiger Autoren, dass nur recht hohe Konzentrationen von Naturstoffen als Saatgutbehandlung wirksam sind (z.B. MISHRA & MISHRA, 1990). Bei einer Allicin-Konzentration, die über  $2000 \mu\text{g ml}^{-1}$  lag, konnte kein positiver Effekt auf den Auflauf mehr beobachtet werden. Dies könnte auf die von BLAESER *et al.* (2002) beschriebene phytotoxische Wirkung hoher Konzentrationen zurückzuführen sein. Eine Wirkung des Knoblauchsafte über die Gasphase, wie er von CURTIS *et al.* (2004) z.B. für *Phytophthora infestans* an Kartoffelknollen beschrieben wurde, konnte in den Versuchen mit *Alternaria*-befallenen Karottensamen nicht festgestellt werden (siehe Abb. 26, Kapitel 4.3.4.1). Nachdem in den ersten Versuchen gezeigt werden konnte, dass das Quellen der Samen in verdünntem Knoblauchsafte einen positiven Effekt auf die Zahl gesunder Keimlinge hat, sollten weitere Versuche in diesem Bereich durchgeführt werden. Um hier einen größeren Probendurchsatz zu ermöglichen, sollte das Anzuchtverfahren von Erde auf Wasseragar-Platten umgestellt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Vergleich zwischen den beiden Anzuchtmethoden mit gleich behandelten Samen gemacht. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Änderung der Anzuchtmethode die Ergebnisse verfälschen würde. Diese Versuche zeigten, dass die Anzahl gesunder Keimlinge sich bei den beiden Anzuchtverfahren zwar teilweise unterschied, dass aber die Einschätzung der Wirksamkeit einer Behandlung im Vergleich zur Wasser-Kontrolle und zur gebeizten Variante (Aatiram®) auch auf Agar-Platten möglich war (siehe Abb. 27, Kapitel 4.3.4.2). So konnte das Versuchssystem auf dieses Anzuchtverfahren umgestellt werden, wodurch sowohl Zeit als auch Platz gespart und damit der Probendurchsatz erhöht werden konnte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Knoblauchsaftebehandlung der Samen in ein praxisübliches „Seed Priming“-Verfahren eingefügt werden kann, wie es von Saatgut-Firmen zur Verbesserung und Synchronisation der Keimung angewendet wird. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten auch JENSEN *et al.* (2004), die die Anwendung eines antagonistischen Pilzes (*Clonostachys rosea*) zur Bekämpfung von *Alternaria* spp. an Karottensamen in ein solches „Seed Priming“-Verfahren integrierten. Die Autoren konnten zeigen, dass die Anzahl gesunder Keimlinge bei Einbindung einer Inkubation mit verschiedenen Isolaten des Pilzes in das

Priming-Verfahren im Vergleich zu nur mit Wasser behandelten Samen deutlich erhöht war. In Anlehnung an die bei JENSEN *et al.* beschriebene Methode wurden die Versuche zur Integration des Knoblauchsafte in ein „Seed Priming“-Verfahren durchgeführt. Auch hier konnte eine signifikante Verbesserung des Auflaufes im Vergleich zur unbehandelten bzw. Wasser-behandelten Kontrolle festgestellt werden (siehe Abb. 28, Kapitel 4.3.4.3). Auch diesmal lag die Anzahl gesunder Keimlinge auf demselben Niveau wie in der Aatiram®-Variante. Ein Unterschied zwischen den eingesetzten Allicin-Konzentrationen von 300, 400 und 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  konnte nicht festgestellt werden. Betrachtet man die Versuche 4.3.4.1 - 3 im Hinblick auf die Ermittlung einer optimalen Allicin-Konzentration für die Samenbehandlung scheint ein Bereich zwischen 300 und 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin einsetzbar zu sein. Eine noch höhere Konzentration führte, wie bereits erwähnt, zu keiner Verbesserung der Keimrate im Vergleich zur unbehandelten bzw. zur Wasser-Kontrolle. Das von JENSEN *et al.* (2004) beschriebene Verfahren ist durch mehrere Rücktrochnungsprozesse und eine zwischenzeitliche 13-tägige Inkubation bei 15°C relativ aufwendig. Darüber hinaus besitzt jede Saatgut-Firma ihr eigenes Protokoll mit unterschiedlich langen Quellzeiten (SLUSARENKO *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde in Folgeuntersuchungen getestet, ob eine verkürzte Quellzeit und das einfache Rücktrochnen auf das Ausgangsgewicht der Samen ausreichen, um einen positiven Effekt auf die Keimung und die Keimlingsgesundheit der *Alternaria*-befallenen Karottensamen zu beobachten. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass statt der nach JENSEN *et al.* angesetzten Quellzeit von 16 Stunden bereits eine vierstündige Inkubation der Samen in verdünntem Knoblauchsaft ausreicht, um die Anzahl gesunder Keimlinge fast um das 40-fache zu erhöhen, was sowohl dem mit einer längeren Quellzeit als auch mit einer Aatiram®-Behandlung erreichten Niveau entsprach (siehe Abb. 29, Kapitel 4.3.4.4). Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Lagerfähigkeit behandelter Samen. Untersuchungen zu diesem Thema ergaben, dass auch nach einer Lagerung der behandelten Samen für ein halbes Jahr bei 10°C kein Wirkungsverlust des Knoblauchs zu verzeichnen war (siehe Abb. 30, Kapitel 4.3.4.5). In der Aatiram®-behandelten Variante konnten nach der Lagerung mehr gesunde Keimlinge gezählt werden. Dies kann jedoch als Ausreißer-Wert betrachtet werden. Es handelte sich hierbei um einen Einzelwert, da die Aatiram®-behandelte Variante nur in einem einzigen Experiment gelagert worden war. Möglicherweise wurden von dieser Probe nach der Lagerung zufällig vermehrt unbefallene Samen ausgesät. Insgesamt spiegelte sich aber nach 6 Monaten Aufbewahrung das Ergebnis des Tests von vor der Lagerung wider. Diese Lagerfähigkeit von behandelten Samen ohne den Verlust der Wirkung gegen einen *Alternaria*-Befall konnte auch von JENSEN *et al.* (2004) nach dem von ihnen beschriebenen „Seed Priming“-Verfahren beobachtet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Desinfektion von *Alternaria*-befallenen Karottensamen durch das Quellen in Knoblauchsaff möglich ist und dies zu einem verbesserten Auflauf führt, der im Bereich einer handelsüblichen Beize (Aatiram®) liegt (SLUSARENKO *et al.*, 2008). Darüber hinaus kann auch die Einbindung dieser Behandlung in ein praxisübliches „Seed Priming“-Verfahren zur Verbesserung der Keimung von Samen erfolgen, wobei auch eine 6-monatige Lagerung der behandelten Samen unproblematisch ist. Zur deutlichen Erhöhung der Anzahl gesunder Keimlinge genügt eine vierstündige Inkubation in einer Knoblauchsaffverdünnung, die 300 – 500 µg ml<sup>-1</sup> Allicin enthält. Aber auch die Verwendung einer doppelt so hohen Allicin-Konzentration hat keinen negativen Effekt. Die Samenbeize stellt demnach neben den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Möglichkeiten zur Bekämpfung von Blattkrankheiten eine weitere Einsatzmöglichkeit des Knoblauchsaffes im Pflanzenschutz dar.

## 5.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Knoblauchsaffes

Neben den Untersuchungen zur Wirksamkeit einer fungiziden Substanz ist auch die Aufklärung des Wirkmechanismus dieser Verbindung von Bedeutung. Insbesondere im Hinblick auf Resistenzen die sich durch die Anwendung von Fungiziden entwickeln können, ist es vorteilhaft, Informationen über den Wirkmechanismus eines Wirkstoffes zu haben, um ihn gezielt im Rahmen eines Resistenzmanagements einsetzen zu können (JENDE, 2001). Besonders die Initialphase, in der der Pilz sich etabliert, ist bestimmend für seine Ausbreitung und bietet verschiedene Angriffspunkte für ein Fungizid (STRUCK *et al.*, 1998).

### *Phytophthora infestans*

Tests zum Einfluss des Knoblauchsaffes auf die Freisetzungsrare von Zoosporen aus Sporangien von *Phytophthora infestans*, als einen der ersten Schritte in der Entwicklung des Erregers, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Schlupfrare zwischen behandelten und unbehandelten Proben (siehe Abb. 31, Kapitel 4.4.1.1). Der Sporenschlupf wird demnach durch die Behandlung mit Knoblauchsaff nicht reduziert. So beginnt der Infektionszyklus des Oomyceten auf behandelten und unbehandelten Blättern mit derselben Anzahl an Zoosporen, die sich encystieren, auskeimen und zur Infektion der Pflanze führen können. Die Inhibition der Ausbreitung des Pilzes muss also zu einem späteren Zeitpunkt im Entwicklungszyklus stattfinden. Um dies zu untersuchen wurden sowohl *in vitro* als auch *in planta* Versuche mit Sporangien und encystierten Zoosporen von *Phytophthora infestans* durchgeführt. Die mikroskopischen Analysen der, auf mit Knoblauchsaff versetzten Agar-Platten inkubierten,

Erregerstrukturen ergaben, dass die Keimung der Sporangien, die dann als Konidien fungieren und hauptsächlich Kartoffelknollen, aber in Einzelfällen auch Blätter infizieren können (STEINER-STENZEL (Universität Bonn), pers. Mitteilung), deutlich reduziert ist (siehe Abb. 32, Kapitel 4.4.1.2). Auch die Keimrate encystierter Zoosporen lag in diesem Fall deutlich unter der von Sporen, die ohne den Zusatz von Knoblauchsafte zum Agar inkubiert worden waren. Zusätzliche *in vitro*-Studien zum Keimschlauchwachstum ließen erkennen, dass die Entwicklung der Keimschläuche sowohl bei ausgekeimten Sporangien als auch bei encystierten Zoosporen durch den Knoblauchsafte beeinträchtigt wird (siehe Abb. 33, Kapitel 4.4.1.3). Die Keimschlauchlänge beider Strukturen wurde um das sechs- bis siebenfache verringert. Ähnliche Effekte konnten auch JENDE *et al.* (1999) beobachten, ausgelöst durch eine Behandlung mit Iprovalicarb, einer systemisch gegen Oomyceten wirkenden Substanz. Der Wirkstoff zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf den Zoosporenschlupf, reduzierte aber sowohl die Keimung von Sporangien und encystierten Zoosporen als auch das Wachstum der gebildeten Keimschläuche. In Versuchen zum Effekt des Knoblauchsafte auf die Entwicklung des Erregers *in planta* konnte nachgewiesen werden, dass die hemmende Wirkung des Knoblauchs auf Keimung und Keimschlauchwachstum von *P. infestans* auch in Pflanzen wiederzufinden war. Sowohl die Ergebnisse der *in vitro*- als auch der *in planta*-Versuche stimmten nicht nur mit den Beobachtungen von JENDE *et al.* (1999) bei Anwendung des Iprovalicarbs überein. Auch Untersuchungen mit weiteren Fungiziden, die, wie das Iprovalicarb, zur Verbindungsklasse der Carboxylsäureamide gehören, erbrachten vergleichbare Resultate hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* (COHEN & GISI, 2007). In den Versuchen mit Knoblauch war darüber hinaus nach der Sprühapplikation einer Verdünnung des Saftes ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  Allicin) die Bildung eines Films auf der Blattoberfläche von Tomatenpflanzen zu sehen. Mit dieser Beobachtung ging eine reduzierte Wiederfindungsrate von Zoosporen und Sporangien einher. Dies deutet daraufhin, dass zusätzlich zu der direkten Wirkung des Knoblauchs auf die Entwicklung des Erregers auch ein indirekter Mechanismus an der Reduktion des Befalls von Tomaten mit *P. infestans* beteiligt sein könnte. Allem Anschein nach führt die Bildung des Spritzbelags zu einer verminderten Anhaftung der Sporen. Die direkte Wirkung auf die frühen Entwicklungsstadien des Erregers, wie sie auch für Iprovalicarb und andere Carboxylsäureamide beschrieben wurde (JENDE *et al.*, 1999; COHEN & GISI, 2007), wird jedoch den größeren Einfluss auf den Befall haben. Dies lässt sich aus der Tatsache schlussfolgern, dass das Ausmaß der Reduktion einer Infektion von Tomatenpflanzen mit *P. infestans* von der Allicin-Konzentration abhängig ist (vgl. Kapitel 4.3 bzw. 5.3) (PORTZ *et al.*, 2008).

### ***Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae***

Zusätzlich zu den mikroskopischen Studien der Wirkungsweise des Knoblauchs, die mit encystierten Zoosporen und Sporangien von *Phytophthora infestans* durchgeführt wurden, wurde der Wirkmechanismus mit Hilfe von Modellorganismen auch auf molekularer Ebene untersucht.

Die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs wird in der Literatur auf die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zurückgeführt, die das Allicin mit freien SH-Gruppen von Enzymen eingeht. Verbindungen, wie das Dithiotreitol (DTT) können als Schutz der SH-Gruppen vor der Oxidation fungieren, indem es zunächst selbst mit ihnen interagiert, sie dann aber wieder freisetzt oder aber mit dem Allicin reagiert und es so austitriert. Tatsächlich konnte die inhibierende Wirkung des Knoblauchsafte auf das *E. coli*-Wachstum im Bioassay durch die Zugabe von DTT reduziert werden. In Abhängigkeit von der verwendeten DTT-Konzentration nahm die durchschnittliche Größe der Hemmhöfe deutlich ab. Dies scheint ein klarer Hinweis darauf zu sein, dass die wachstumshemmende Wirkung des Knoblauchs durch eine Interaktion des Allicins mit SH-Gruppen zustande kommt (PORTZ *et al.*, 2005). Auch ANKRI *et al.* konnten beobachten, dass die Inhibierung von Cystein-Proteinasen durch Allicin mit Hilfe einer DTT-Behandlung rückgängig gemacht werden kann. Ebenso zeigten RABINKOV *et al.* (1998), dass die Reaktion des Allicins mit L-Cystein, bei der die freien SH-Gruppen des Cysteins chemisch modifiziert werden, durch DTT umgekehrt werden kann.

Durch die Reaktion des Allicins mit SH-Gruppen kommt es auch zur Oxidation von Glutathion (JACOB, 2006). Da das Redoxpaar GSSG / 2GSH von den in Zellen vorkommenden Redox-Puffern den größten Anteil ausmacht, kann es als Indikator für den Redox-Status der Zelle angesehen werden (SCHAFER & BUETTNER, 2001). Eine Oxidation des Glutathions verschiebt das Reduktionspotential des Paares und könnte damit auch den biologischen Status der Zelle beeinflussen, wenn die Änderung des Reduktionspotentials groß genug ist. In eigenen Versuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* konnte durch Allicin eine deutliche Verschiebung des Reduktionspotential des Redox-Paares GSSG / 2GSH zum oxidierten Zustand hin hervorgerufen werden (siehe Tab. 10, Kapitel 4.4.3.1). Nach einer Behandlung der Hefe-Zellen mit Knoblauchsafte konnte ein Reduktionspotential des Glutathions zwischen -165,8 mV und -167 mV ermittelt werden, abhängig davon, ob bei der Kalkulation des Zellvolumens 20% als Volumen der Vakuole abgezogen wurden oder nicht. In unbehandelten Zellen liegt das Reduktionspotential im Bereich von -200 mV und niedriger. SCHAFER & BUETTNER (2001) beschrieben, dass Zellen bei einem Reduktionspotential des Glutathion-Paares zwischen

-180 mV und -160 mV Apoptose einleiten. Die Reaktion des Allicins mit dem reduzierten Teil des Glutathions löst demnach in den Zellen eine sogenannte Redox-Katastrophe (COLLATZ, 2001) aus, die zur Induktion von Apoptose führt. In den durchgeführten Versuchen konnte darüber hinaus eine Abnahme des Gesamt-Glutathiongehalts in Zellen, die mit Knoblauchsaff behandelt worden waren, festgestellt werden. Dies weist daraufhin, dass es sich bei der Verschiebung des Reduktionspotentials um eine direkte Wirkung des Allicins durch die Reaktion mit dem GSH handelt, wie sie von JACOB (2006) beschrieben wurde, und nicht um einen sekundären Effekt. Einen weiteren Hinweis darauf, dass durch das im Knoblauchsaff befindliche Allicin Apoptose ausgelöst wird, erbrachte die in eigenen Versuchen mit Zellen zweier Hefe-Stämme nachgewiesene Caspase-Aktivität in mit Knoblauchsaff inkubierten Zellen (siehe Abb. 36 und 37, Kapitel 4.4.3.2). Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte darüber hinaus ein Beweis dafür erbracht werden, dass das Allicin die Substanz im Knoblauchsaff ist, welche die erwähnte Caspase-Aktivität und somit die Apoptose induziert. Von Hefe-Zellen, die mit einer Konzentration an reinem Allicin behandelt wurden, die der im parallel verwendeten Knoblauchsaff gemessenen Konzentration entsprach, wies derselbe Anteil eine Caspase-Aktivität auf. Die beiden verwendeten Hefe-Stämme reagierten allerdings unterschiedlich empfindlich auf die Knoblauchsaff-Behandlung. So konnte durch die Behandlung mit einer niedrigen Allicin-Konzentration ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) bei beiden Stämmen das Wachstum stark reduziert werden. Beim Stamm RS 453 geschah dies auch noch bei einer viermal so hohen Allicin-Konzentration, wohingegen die Zellen des zweiten Stammes ihr komplettes Wachstum einstellten. Demnach wurde in Zellen des Stammes SS 330 durch die höhere Allicin-Konzentration bereits eine Nekrose statt einer Apoptose ausgelöst. Wie bereits erwähnt, konnte ein solcher Unterschied in der Sensitivität verschiedener Stämme eines Pilzes gegenüber fungizider Substanzen auch von ORTEGA *et al.* (1997) bei *Venturia inaequalis* beobachtet werden. Die Induktion von Apoptose durch Allicin konnte bereits von verschiedenen Autoren bei Krebszellen nachgewiesen werden (SUN & WANG, 2003; ZHANG *et al.*, 2006). Auch die Caspase-Aktivität als auslösender Mechanismus der Allicin-induzierten Apoptose konnte bereits anhand von Versuchen mit Krebszellen gezeigt werden (OOMMEN *et al.*, 2004). In Kombination mit den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnissen, scheint die Apoptose-Induktion als ein genereller Wirkmechanismus des Allicins und damit des Knoblauchsaffes angesehen werden zu können. Aufgrund der Zugehörigkeit der Hefe zum Reich der Pilze kann dieser Wirkmechanismus auch auf pilzliche und pilzähnliche Erreger von Pflanzenkrankheiten übertragen werden. Dass die Apoptose einen Einfluss auf die Entwicklung phytopathogener Pilze haben kann, konnte bereits

von BARHOOM & SHARON (2007) am Beispiel des Pilzes *Colletotrichum gloeosporioides* gezeigt werden.

So kann die anhand eines Modellorganismus nachgewiesene Apoptose-Induktion durch die Reaktion des Allicins mit SH-Gruppen, wie sie u.a. durch die Aufhebung der Knoblauchwirkung im *E. coli*-Bioassay durch DTT gezeigt werden konnte, auch als molekulare Ursache für die Reduktion der Keimung und des Keimschlauchwachstums von *Phytophthora infestans*-Sporangien und -Zoosporen angenommen werden. Grundsätzlich scheint die Wirkung des Knoblauchs also stets auf der Interaktion des Allicins mit SH-Gruppen zu beruhen, sei es mit freien SH-Gruppen von Enzymen oder, wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, mit der SH-Gruppe des Glutathions und der damit verbundenen Verschiebung des Reduktionspotentials. Daraus ergeben sich viele mögliche Angriffspunkte des Allicins, so dass man von einem „multi-site“ Wirkstoff sprechen kann (PORTZ *et al.*, 2008). Die Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung gegen eine solche Substanz ist äußerst gering (DAMICONE, 2007), was ihr Potential als Pflanzenschutzmittel erhöht.

## 5.5 Synthese der Alliinase aus Knoblauch in Fremdorganismen

Außer der direkten Anwendung des Knoblauchsafes als Pflanzenschutzmittel wäre auch ein gentechnischer Ansatz zur Bekämpfung von phytopathogenen Organismen denkbar. Dabei würde das für die Allicin-Synthese verantwortliche Enzym, die Alliinase, in einer fremden Pflanzenspezies produziert. Dies wäre jedoch nur umsetzbar, wenn die Expression des Alliinasegens aus Knoblauch in Fremdorganismen möglich ist. Um dies zu prüfen, wurde ein Alliinasegen aus Knoblauch in der vorliegenden Arbeit kloniert und sowohl in Hefe-Zellen als auch in *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen eingebracht. Der Vergleich der in eigenen Arbeiten amplifizierten Sequenz mit zwei veröffentlichten cDNA-Sequenzen (VAN DAMME *et al.*, 1992; RABINKOV *et al.*, 1994) wies nur geringe Abweichungen auf, wobei diese sich immer nur auf eine der beiden Vergleichssequenzen bezog. Leichte Abweichungen in cDNA-Sequenzen des Alliinasegens waren zu erwarten, da das Enzym durch eine Genfamilie kodiert wird (VAN DAMME *et al.*, 1992).

### *Saccharomyces cerevisiae*

1998 gelang WEIK *et al.* die Expression des Alliinasegens aus Knoblauch bereits in dem Bakterium *Escherichia coli* sowie den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*.

Eine Alliinase-Aktivität konnte jedoch lediglich in *Pichia pastoris* gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die unter 4.5.1 beschriebenen Konstrukte, die die in eigenen Arbeiten amplifizierte cDNA der Alliinase aus Knoblauch beinhalteten, in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. Die Produktion der Alliinase in Hefe konnte durch eine Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (siehe Abb. 39, Kapitel 4.5.1). Der Vergleich von Konstrukten, die nur das Alliinasegen enthielten mit solchen, die zusätzlich noch die Sequenz für ein mögliches Sortierungssignal beinhalteten (vgl. Kapitel 4.5), zeigte, dass lediglich ohne die Signalsequenz ein Protein detektiert werden konnte, welches die Größe der natürlichen Alliinase aus Knoblauch aufwies. Da es sich bei der Alliinase um ein Homodimer handelt (KUETTNER *et al.*, 2002a, b), ist anzunehmen, dass die zusätzlichen Banden im Western Blot durch noch nicht zusammengelagerte Untereinheiten zustande gekommen sind. An Polypeptiden gebundene Signale dienen dem Transport des Proteins zu seinem Zielkompartiment in der Zelle. Ist das Protein dort angekommen, kann das Sortierungssignal an einer spezifischen Schnittstelle abgespalten werden. Da es sich bei Hefe um einen Fremdorganismus handelt, ist es möglich, dass die Schnittstelle des Signals der Alliinase von Hefe-Enzymen nicht erkannt wird und so dass Peptid nicht abgespalten wurde. Dies führte zur Produktion eines größeren Proteins, wie es im Western Blot anhand der über den Banden der nativen Alliinase liegenden Banden nachgewiesen werden konnte. Für die Messung der Alliinase-Aktivität wurden nur Proteine aus Zellen verwendet, die mit dem Konstrukt ohne putative Signalsequenz transformiert worden waren. Damit sollte einer Inaktivierung des Enzyms durch Fehlfaltung aufgrund eines nicht entfernten Sortierungssignals vorgebeugt werden. Obwohl die Proteine aus den Hefe-Zellen in Anlehnung an die bei WEIK *et al.* (1998) beschriebene Methode aufgereinigt wurden, konnte keine Alliinase-Aktivität gemessen werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den eigenen Arbeiten eine andere cDNA-Sequenz verwendet wurde, die in Hefen nicht zur Synthese einer aktiven Alliinase führt. Bei WEIK *et al.* wurden keine Angaben zur verwendeten Sequenz gemacht. Darüber hinaus wäre es aber auch denkbar, dass die Rückfaltung des Proteins, aufgrund geringer Abweichungen vom Protokoll nach WEIK *et al.*, fehlerhaft verlaufen ist, da die Autoren in der Veröffentlichung nicht sehr detailliert auf diese Methode eingingen. Denkbar wäre auch, dass es nicht möglich ist, mit der angewendeten Methode die in *Saccharomyces cerevisiae* gebildeten „inclusion bodies“ aufzuschließen. Zwar wurden diese Strukturen auch von WEIK *et al.* beobachtet, jedoch konnten auch diese Autoren keine Aktivität der in dieser Hefe-Gattung hergestellten Alliinase nachweisen. Sie zeigten lediglich eine Aktivität der Alliinase, die sie aus *Pichia pastoris* aufgereinigt hatten. Durch die parallele Klonierung der zur *Arabidopsis*-Transformation

verwendeten Alliinase-Konstrukte in *Saccharomyces cerevisiae* konnte demnach keine Aussage zur möglichen Synthese einer aktiven Knoblauch-Alliinase in Fremdorganismen gemacht werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass ein Protein produziert wird, das vom Alliinase-spezifischen Antikörper erkannt wird und auch die erwartete Größe aufweist, eine Alliinase-Aktivität konnte für dieses Protein jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der vielen möglichen Ursachen für das Ausbleiben der Aktivität kann aber nicht endgültig der Rückschluss gezogen werden, dass die Synthese einer aktiven Alliinase aus Knoblauch in Fremdorganismen nicht möglich ist, zumal eine fremde Pflanzenspezies immer noch einen höheren Verwandtschaftsgrad zum Knoblauch zeigt, als Hefe. So wäre es denkbar, dass z.B. die Schnittstelle des putativen Sortierungssignals von den pflanzlichen Enzymen sehr wohl erkannt und somit die post-translationale Modifikation in Pflanzen fehlerfrei ablaufen wird.

### *Arabidopsis thaliana*

Sowohl in *Arabidopsis*-Pflanzen des Ökotyps „Columbia“ als auch in Pflanzen des Ökotyps „Landsberg erecta“ konnte das Gen der Alliinase aus Knoblauch erfolgreich eingebracht werden. PCR-Analysen der genomischen DNA verschiedener Individuen aus T3-Linien, die bei einer Anzucht auf Selektionsmedium keine Aufspaltung mehr aufwiesen, zeigten, dass das Alliinasegen in das Genom der untersuchten Pflanzen eingebaut worden war (siehe Abb. 41, 42 und 43, Kapitel 4.5.2.2). Insgesamt wurden 21 Linien identifiziert, die für die eingebrachte DNA homozygot waren. Auch die Expressionsanalyse, die mittels RNA aus den entsprechenden Linien durchgeführt wurde, erbrachte einige Linien beider Ökotypen, die ein positives Ergebnis zeigten (siehe Abb. 44 und 45, Kapitel 4.5.2.3). Bei einigen dieser Linien widersprachen sich jedoch die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse und der RT-PCR. So wiesen diese Linien zwar im Northern Blot eine Bande in der erwarteten Höhe auf, erbrachten in einer RT-PCR mit derselben RNA als Matrize aber zu kleine oder gar keine Banden. Eine Sequenzierung der Fragmente ergab, dass es sich bei den Banden, die eine geringere Größe als die erwartete zeigten, um Bruchstücke des Alliinasegens handelte (siehe Abb. 48, Kapitel 4.5.2.4). Eine weitere Untersuchung, bei der die cDNA der Alliinase durch eine Restriktion um wenige Basenpaare verkürzt und dann als Matrize verwendet wurde, wies daraufhin, dass schon der Verlust von 160 bp dazu führt, dass die bei der Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sich an einer dem 5'-Ende der Sequenz näher gelegenen Stelle anlagern und so zur Amplifikation eines kleineren Fragmentes führen (siehe Abb. 49, Kapitel 4.5.2.4). Es ist also anzunehmen, dass bei den Linien, die in der RT-PCR Banden mit einer geringeren Größe als der des Alliinasegens ergaben, lediglich eine verkürzte Sequenz des Transgens in das Genom eingebaut worden war.

Da die Deletion allerdings nicht den Teil der Alliinase-Sequenz betrifft, der als Grundlage für die Herstellung der RNA-Sonde fungierte, wiesen die betroffenen Linien im Northern Blot eine Bande auf. Der äußerst geringe Größenunterschied zur RNA des gesamten Alliinasegens war aufgrund der geringen Auflösung dieses Analyse-Verfahrens nur schwer festzustellen. Ein solcher Einbau verkürzter DNA-Sequenzen nach der Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Hilfe von Agrobakterien konnte auch von MEZA *et al.* (2002) beobachtet werden. Bei der Insertion der Fremd-DNA (T-DNA) in das pflanzliche Genom nach der Agrobakterienvermittelten Transformation handelt es sich um einen mehrschrittigen Prozess, der sowohl Rekombinations- als auch lokale Replikations- und Reparatur-Mechanismen beinhaltet (GHEYSEN *et al.*, 1987). Jeder dieser Schritte kann fehlerhaft verlaufen und zur Deletion einiger Basenpaare führen. Darüber hinaus postulieren die Autoren, dass der Transfer des T-DNA-Stranges zur Pflanzenzelle analog zum DNA-Transfer durch bakterielle Konjugation verläuft. Im Verlauf dieses Prozesses kann es zum verfrühten Abbrechen des DNA-Transfers kommen, wodurch nur ein unvollständiges Sequenzstück übertragen wird (CAMPBELL, 1997).

Bei der Messung der Alliinase-Aktivität zeigte sich, dass auch durch Proteinextrakte aus Wildtyp-Pflanzen der beiden Ökotypen das Substrat Alliin umgesetzt werden konnte. Ebenso wiesen transgene Pflanzen, welche den Expressionsanalysen zufolge keine Alliinase produzierten, eine Alliinase-Aktivität auf, die der der Wildtyp-Pflanzen entsprach (siehe Abb. 50 und 51, Kapitel 4.5.2.5). Eine solche Beobachtung war aufgrund des Vorhandenseins Alliinase-ähnlicher Proteine in *Arabidopsis thaliana* nicht überraschend (z.B. At1g34060; „Alliinase family protein“). Darüber hinaus zählt die Alliinase zur Familie der Cystein-Lyasen (CS-Lyasen), von der noch weitere Mitglieder in *Arabidopsis* identifiziert wurden (JONES *et al.*, 2003). Da CS-Lyasen Verbindungen spalten, die Cystein enthalten, könnte ein solches Enzym auch das Cystein-Derivat Alliin umsetzen. Auch bei dieser Reaktion würde Pyruvat entstehen, welches in der zur Alliinase-Aktivitätsmessung verwendeten indirekten Methode zu einer Abnahme der Absorption führen würde. Somit kann die in Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen, welche keine transgene Alliinase-Expression zeigten, gemessene Alliinase-Aktivität auf die Aktivität endogener Alliinase-ähnlicher Proteine und CS-Lyasen zurückgeführt werden. Unter den transgenen Linien, bei denen sowohl die Integration des Transgens in das Genom durch PCR als auch die Expression des Alliinasegens mittels RT-PCR und Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden konnte, wurde lediglich bei einzelnen genetisch unabhängigen Linien eine erhöhte Alliinase-Aktivität festgestellt (siehe Abb. 50 und 51, Kapitel 4.5.2.5). Dennoch weist dies daraufhin, dass die Synthese einer aktiven Alliinase aus Knoblauch in Pflanzen einer

fremden Spezies durchaus möglich ist. Dass nicht in allen Linien, bei denen eine Expression des Alliinasegens nachgewiesen werden konnte, auch eine gesteigerte Alliinase-Aktivität zu verzeichnen war, kann durch generelle Probleme bei der Herstellung transgener Organismen erklärt werden. So kann es zur Integration mehrerer Kopien der fremden DNA-Sequenzen kommen (MEZA *et al.*, 2002). Auch der Einbau von Teilen des zur Transformation verwendeten Vektors wurde bereits mehrfach beobachtet (RAMANATHAN & VELUTHAMBI, 1995; KONONOV *et al.*, 1997; WENCK *et al.*, 1997; DE BUCK *et al.*, 2000). Die beschriebenen Phänomene können zur Homologie-abhängigen Inaktivierung der übertragenen Gene führen. Dies kann sowohl durch transkriptionelle „silencing“-Mechanismen, wie Promotor-Methylierung und DNA-DNA-Interaktionen, als auch durch post-transkriptionelle Mechanismen, wie den Abbau fremdartiger mRNA, geschehen (STAM *et al.*, 1997; KOOTER *et al.*, 1999). Die nur teilweise nachweisbare Erhöhung der Alliinase-Aktivität nach erfolgreicher Agrobakterien-vermittelter Transformation kann demnach auf allgemeinen Schwierigkeiten bei der Herstellung transgener Pflanzen beruhen. Unter den Linien des Ökotyps „Columbia“ zeigten nur solche eine erhöhte Alliin-Umsatzrate, die das Alliinasegen mit der von VAN DAMME *et al.* (1992) vorhergesagten möglichen Signalsequenz enthielten. Dies könnte als Hinweis auf eine tatsächliche Sortierungsfunktion der Signalsequenz angesehen werden. Liegt diese nicht vor, wird das Polypeptid möglicherweise an einem falschen Ort freigesetzt und dort abgebaut (LODISH *et al.*, 2007). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass die Synthese einer aktiven Alliinase aus Knoblauch in Pflanzen einer fremden Spezies möglich ist. Allerdings scheint die von VAN DAMME *et al.* (1992) vorhergesagte mögliche Signalsequenz für die Synthese einer aktiven Alliinase notwendig zu sein. Damit konnte bereits der erste Schritt des gentechnischen Ansatzes zur Verwendung des aktiven Prinzips aus Knoblauch zum Schutz anderer Pflanzen vor phytopathogenen Organismen mit einem positiven Ergebnis abgeschlossen werden.

## 5.6 Studien zur Lokalisation der Alliinase aus Knoblauch

Bisher konnte lediglich für die Alliinase aus Zwiebel (*Allium cepa*) eine Lokalisation in Vakuolen nachgewiesen werden (LANCASTER & COLLIN, 1981). Zwar wird angenommen, dass auch die Alliinase in Knoblauch in Vakuolen gespeichert wird, jedoch wurde sowohl von ELLMORE & FELDBERG (1994) als auch von YAMAZAKI *et al.* (2002) lediglich die Lokalisation in Bündelscheidezellen gezeigt. Die subzelluläre Lokalisation der Alliinase wurde in Knoblauch bis jetzt nicht beschrieben. Ebenso fehlen Untersuchungen zur Funktion der von VAN DAMME *et al.*

(1992) veröffentlichten putativen Signalsequenz. Die Autoren vermuteten eine Rolle beim Transport des Proteins in die Vakuole. Darüber hinaus wiesen sie auf eine zusätzliche Sequenz von zehn Aminosäuren hin, die sich hinter der vorhergesagten Schnittstelle des putativen Sortierungssignals und vor der „reifen“ Alliinase befindet und ebenfalls in den Transport der Alliinase involviert sein könnte (siehe Anhang 1). Mit Hilfe von Computer-Programmen konnte auch in der von RABINKOV *et al.* (1994) veröffentlichten cDNA-Sequenz eine mögliche Signalsequenz identifiziert werden (siehe Anhang 2). Die transiente Expression der drei möglichen Signalsequenzen gekoppelt an das Gen der  $\alpha$ -Amylase aus Gerste zeigte, dass nur die Signalsequenz nach VAN DAMME *et al.* mit den zusätzlichen 10 Aminosäuren zu einer gut messbaren Amylase-Aktivität führt (siehe Tab. 16, Kapitel 4.6.1). Neben anderen Modifikationen wird bei vielen Proteinen das Signalpeptid nach der Translokation ins ER an spezifischen Schnittstellen durch sogenannte Signal-Peptidasen abgespalten (LODISH *et al.*, 2007). Geschieht dies nicht oder fehlerhaft, kann es zur Fehlfaltung des Proteins kommen. Ungefaltete oder falsch gefaltete Proteine verbleiben im rauen ER oder werden ins Cytosol transportiert, wo sie über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut werden (*Ibid.*). Möglicherweise wurde bei den beiden kürzeren Peptiden die Schnittstelle nicht erkannt. Dies könnte eine Fehlfaltung des Proteins und damit eine äußerst geringe Aktivität im Fall der Sequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992) bzw. eine komplette Inaktivität der  $\alpha$ -Amylase bei Verwendung der Sequenz nach RABINKOV *et al.* (1994) zur Folge haben. Die im Vergleich zur zellinternen Aktivität erhöhte Amylase-Aktivität im Medium bei mit dem erstgenannten Konstrukt (Amy + TS2) transformierten Zellen, gab erste Hinweise auf eine Sekretion der an die Signalsequenz der Alliinase (inklusive der 10 zusätzlichen Aminosäuren) gebundenen  $\alpha$ -Amylase. Um dies genauer zu untersuchen wurden verschiedene Ansätze getestet, die einen Proteintransport in Vakuolen blockieren und zu einer deutlich erhöhten Sekretion des Proteins führen würden. Wie von PIMPL *et al.* (2003) ausführlich diskutiert, trägt das Sporamin aus Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) ein signal-spezifisches vakuoläres Sortierungssignal. Koppelt man dieses an die  $\alpha$ -Amylase aus Gerste, wird diese über den BP80-abhängigen Weg in die Vakuole transportiert. Bei einer Co-Transformation mit einem BP80-Konstrukt, bei dem die Ligandenbindestelle durch ein GFP ersetzt wurde, wird der Transport in die Vakuole blockiert und die Amylase sekretiert. Mit zunehmender BP80-GFP Menge steigt der sekretorische Index stark an (DASILVA *et al.*, 2005). Derselbe Effekt konnte bei Zugabe von Wortmannin zum Kulturmedium der transformierten Protoplasten beobachtet werden (*Ibid.*). Im Vergleich zur unveränderten Amylase (pAMY) zeigte sich bei der an die Alliinase-Signalsequenz gekoppelten  $\alpha$ -Amylase (pAMY+TS2) weder durch eine Zugabe von 33  $\mu$ M Wortmannin noch durch eine

Co-Transformation mit dem modifizierten vakuolären Sorting-Rezeptor BP80 ein deutlicher Unterschied in der Steigerung der Sekretion des Proteins (siehe Abb. 53, Kapitel 4.6.1). Es konnte maximal eine Verdopplung des sekretorischen Indexes festgestellt werden, die auch bei der unveränderten Amylase zu beobachten war. Wie PHILLIPSON *et al.* (2001) beschrieben, ist die  $\alpha$ -Amylase ein natürlich sekretiertes Protein. Die beschriebenen Ergebnisse der Versuche mit Wortmannin und BP80-GFP deuteten also ebenfalls auf eine Induktion der Sekretion durch die Signalsequenz der Alliinase hin. Diese Annahme wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt. Führt man eine Co-Transformation der Amylase-Konstrukte mit verschiedenen Mengen des BP80-Konstruktes durch, zeigte sich bei einer Kombination der  $\alpha$ -Amylase mit dem Sporamin-Sortierungssignal ein nicht-linearer Anstieg des sekretorischen Indexes in Abhängigkeit von der BP80-GFP-Konzentration (siehe Abb. 54 A, Kapitel 4.6.1). Bei der höchsten BP80-GFP-Konzentration wurde die Amylase-Sekretion um einen Faktor von 14,5 verstärkt. Dies entsprach etwa den Beobachtungen von DASILVA *et al.* (2005). Im Gegensatz dazu zeichnete sich die Fusion der  $\alpha$ -Amylase mit der Signalsequenz der Alliinase durch einen geringen linearen Anstieg des sekretorischen Indexes in Abhängigkeit von der BP80-GFP-Menge aus (siehe Abb. 54 B, Kapitel 4.6.1). Der SI konnte in diesem Fall maximal um einen Faktor von 2,5 erhöht werden. Ein weiterer Unterschied zum Sporamin-Sortierungssignal lag in der durchschnittlichen Höhe des sekretorischen Indexes, die bei der Alliinase-Signalsequenz etwa 20-fach über dem des Sporamin-Sortierungssignals lag. Beide Effekte entsprechen denen, die von DASILVA *et al.* (2005) für die unveränderte und somit sekretierte  $\alpha$ -Amylase beschrieben wurden. Die Untersuchungen mit Hilfe der  $\alpha$ -Amylase wiesen also deutlich darauf hin, dass die Signalsequenz der Alliinase kein vakuoläres Sortierungssignal darstellt. Die Sekretion eines Proteins ist jedoch ohne jegliche Signale möglich (DENECKE *et al.*, 1990), solange das Polypeptid über ein Signalpeptid verfügt, das die Translokation durch die ER-Membran ermöglicht. Somit wäre es denkbar, dass es sich bei der N-terminalen Sequenz der Alliinase um ein gewöhnliches ER-Signalpeptid handelt.

Auch durch die Fusion der Signalsequenz der Alliinase mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konnte weder in Tabak-Protoplasten noch in Zwiebelepidermiszellen eine Lokalisation des Proteins in Vakuolen gezeigt werden. Vielmehr konnte das GFP im ER nachgewiesen werden. Dies war gut an den klar abgegrenzten, grün-fluoreszierenden Strängen des ERs, die sich durch die gesamte Zelle zogen, zu erkennen. Im Gegensatz dazu wiesen Zellen, die mit dem unveränderten GFP transformiert worden waren, eine Fluoreszenz der deutlich diffuseren transvakuolären Cytosolstränge auf. Auch das Auffinden des GFP in einem abgegrenzten Kreis

um den Zellkern, in Zellen, die mit dem GFP-Konstrukt transformiert worden waren, das die Alliinase-Signalsequenz beinhaltet, weist auf eine Lokalisation im ER hin. Da das ER in die Kernhülle übergeht, ist es fest mit dem Kern verbunden. Ähnliche Bilder konnten auch von BRANDIZZI *et al.* (2003) aufgenommen werden, nachdem sie Tabak-Protoplasten mit einem im ER lokalisierten GFP (GFP-HDEL) transformiert hatten. Bei den beobachteten „punktförmigen“ Strukturen könnte es sich um ER-Exportdomänen, Golgi-Stapel oder post-Golgi endosomale Kompartimente handeln, die als Zwischenstadium auf dem Weg zur Vakuole oder der Plasmamembran fungieren. Die genannten Strukturen konnten von YANG *et al.* (2005) durch Fusion des GFP mit einem Protein der Vesikelhüllschicht visualisiert werden. Darüber hinaus konnten die Autoren mit Hilfe von GFP-gekoppelten Golgi-Markern Golgi-Stapel anfärben. Vergleicht man diese Bilder und die Protoplasten, die mit einer Fusion der Signalsequenz der Alliinase und dem GFP-codierenden Gen transformiert worden waren, könnte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen „punktförmigen“ Strukturen um Golgi-Stapel handeln. Zur eindeutigen Klärung um welche Struktur es sich bei den „Punkten“ handelt, müssten Versuche zur Co-Lokalisation mit bekannten Markern für die drei möglichen Strukturen durchgeführt werden. Mit den bisherigen Ergebnissen kann lediglich festgestellt werden, dass die Signalsequenz der Alliinase zur Translokation in das ER-Lumen und damit zur weiteren Synthese und Faltung des fusionierten Proteins führt. Von dort wird das Protein dann zum Golgi-Apparat transportiert und anschließend sekretiert. Ob dieser Weg jedoch der endogenen Lokalisation der Alliinase entspricht kann nicht ohne Weiteres festgelegt werden. Hierzu sollten Versuche mit einer Fusion der Alliinase-Signalsequenz, der Alliinase und eines Reporterproteins durchgeführt werden. Auf diese Weise wäre es möglich zu klären, ob die Alliinase ein internes Signal für den Transport in eine Vakuole enthält, wie es für manche Speicherproteine beschrieben worden ist (MATSUOKA & NEUHAUS, 1999). Häufig spielt dabei die Aggregation der Proteine eine Rolle. So konnten z.B. LEVANONY *et al.* (1992) zeigen, dass eine Aggregation von Getreide-Prolamin kurz nach der Proteinsynthese zur Bildung von Proteinkörpern führt, die sich vom ER, in dem die Synthese stattfindet, abschnüren. Die Akkumulation der Speicherproteine der Legumin- und Vicelin-Familie aus Leguminosen führt zur Abschnürung von Transportvesikeln vom Golgi-Apparat ohne die Beteiligung von Sortierungssignalen (ROBINSON *et al.*, 1998). Für die Alliinase wäre also der folgende Weg denkbar: durch das Signalpeptid wird das Protein ins ER transportiert, von wo aus es in den Golgi-Apparat gelangt. Durch Akkumulation oder Aggregation des Proteins schnüren sich dort Transportvesikel ab, die anschließend mit der Speichervakuole verschmelzen und so zur Lokalisation der Alliinase in der Vakuole führen. Sollte sich herausstellen, dass die Alliinase kein internes Signal für den

Transport zur Vakuole besitzt, wäre anzunehmen, dass die räumliche Trennung des Enzyms von seinem Substrat nicht durch den Einschluss des Proteins in eine Vakuole zustande kommt. In diesem Fall wäre zu vermuten, dass die Alliinase wie die  $\alpha$ -Amylase sekretiert wird und sich im extrazellulären Raum befindet. Dies erscheint jedoch aufgrund der sowohl von ELLMORE & FELDBERG (1994) als auch von YAMAZAKI *et al.* (2002) beschriebenen Lokalisation der Alliinase in Bündelscheidzellen von Knoblauchzehen recht unwahrscheinlich.

## 5.7 Schlussfolgerungen

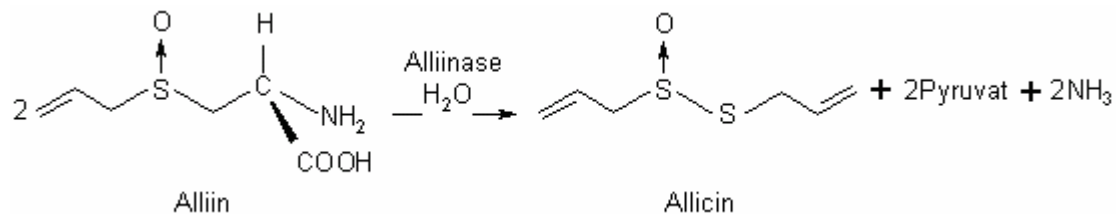
Es konnten verschiedene Anwendungsmethoden des Knoblauchsafte zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten gefunden werden, die teilweise eine vergleichbar gute Wirkung zeigten wie auf dem Markt befindliche Pflanzenschutzmittel. Aus diesem Grund erscheint die Weiterentwicklung der gezeigten Einsatzmöglichkeiten, sowohl im Hinblick auf eine Formulierung des Knoblauchsafte, insbesondere für die Anwendung unter Gewächshausbedingungen oder im Hobbygarten, als auch hinsichtlich der Integration in Saatgutbehandlungen interessant. Dazu wären jedoch noch weitere Untersuchungen, in die auch eine Kosten-Nutzen-Analyse einbezogen werden sollte, notwendig. Da die Wirkung des Knoblauchsafte auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden kann, wie die Interaktion des Allicins mit SH-Gruppen von Enzymen oder, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, auf Apoptose-Induktion, kann man beim Knoblauchsaft von einem „multi-site“ Fungizid sprechen. Dies macht die Ausbildung von Resistenzen phytopathogener Organismen äußerst unwahrscheinlich und steigert die Attraktivität des Knoblauchs bzw. des Allicins für den Pflanzenschutz. Eine direkte Anwendung erscheint besonders für den ökologischen Landbau interessant, wohingegen für die konventionelle Landwirtschaft eher eine Verwendung des Allicins als Leitstruktur für die Entwicklung einer neuen Fungizid-Klasse denkbar wäre. Aufgrund der positiven Ergebnisse zur Expression des Alliinasegens in fremden Pflanzenspezies, stellt auch der beschriebene gentechnische Ansatz eine interessante Nutzungsmöglichkeit des antimikrobiellen Prinzips des Knoblauchs im Pflanzenschutz dar. Auch in diesem Bereich stehen jedoch noch einige Optimierungsarbeiten aus. Sobald der Biosyntheseweg des Allicins aufgeklärt ist, wäre es denkbar den gesamten Weg vom Cystein bis zum Allicin in Zielpflanzen einzubringen, um eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen zu erzielen.

Bezüglich der subzellulären Lokalisation der Alliinase konnte in Untersuchungen mit der Alliinase-Signalsequenz und an sie gekoppelte Reportergene gezeigt werden, dass es sich bei der

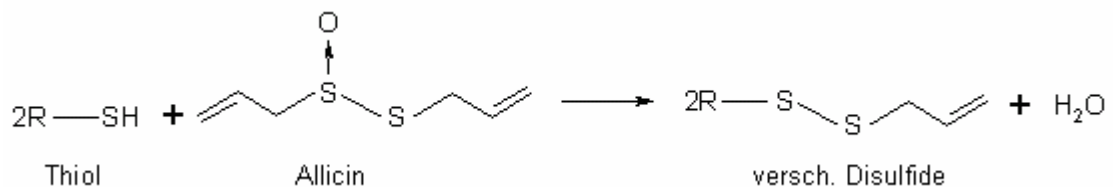
Signalsequenz mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Signalpeptid handelt, das zur Translokation der Alliinase durch die ER-Membran führt. Die Lokalisation der Alliinase konnte mit diesen Studien jedoch nicht endgültig aufgeklärt werden. Aus diesem Grund sollten auch zu diesem Thema weitere Untersuchungen gemacht werden. So sollten Co-Lokalisationsstudien des GFP-Konstrukts mit der Signalsequenz der Alliinase und bekannten Markern für ER-Exportdomänen, Golgi-Stapel oder post-Golgi endosomale Kompartimente getätigt werden. Auch Studien mit der gesamten Alliinase-Sequenz an ein Reporter-gen wie das GFP fusioniert sollten durchgeführt werden, um die Frage der intrazellulären Lokalisation der Alliinase endgültig beantworten zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die antimikrobielle Wirksamkeit des Knoblauchs (*Allium sativum*), die hauptsächlich durch das Diallylthiosulfinat „Allicin“ verursacht wird, ist schon seit vielen Jahrhunderten bekannt. Das Allicin wird gebildet, wenn Knoblauchgewebe verletzt wird und so das Substrat Alliin ((+)-S-2 Propenyl-L-cystein-S-oxid) mit dem Enzym Alliinase (EC 4.4.1.4) zusammenkommt.



Das Allicin ist leicht membranpermeabel und geht häufig Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ein. Es wird angenommen, dass diese Eigenschaften für die antimikrobielle Wirkung des Allicins verantwortlich sind.



Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Beitrag zur möglichen Entwicklung eines Knoblauch-basierten Pflanzenschutzmittels zu leisten. Dies sollte auch Studien zur Wirkungsweise des Knoblauchs bzw. des Allicins beinhalten. So wurde die Effektivität von in Knoblauchsft enthaltenem Allicin zur Bekämpfung verschiedener Pflanzenkrankheiten getestet. Für diese Untersuchungen wurden Modellpathogensysteme wie Tomate (*Solanum lycopersicum*) / *Phytophthora infestans* und *Solanum lycopersicum* / *Alternaria solani* verwendet, aber auch Systeme mit samenbürtigen Krankheiten wie Karotte (*Daucus carota*) / *Alternaria* spp.. Auf diese Weise konnten verschiedene Anwendungsmöglichkeiten des Knoblauchsftes zur Behandlung von Pflanzen gegen phytopathogene Organismen gefunden werden, die teilweise eine vergleichbar gute Wirkung zeigten wie auf dem Markt befindliche Pflanzenschutzmittel. Versuche zur Formulierung des Knoblauchsftes, um die Langzeitwirkung zu verbessern, erbrachten einige positive Ergebnisse. Auch erste Freilandversuche zur Kontrolle der Krautfäule an Kartoffel wurden durchgeführt.

Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Knoblauchsftes zeigten eine deutliche Reduktion der Keimrate und des Keimschlauchwachstums von Sporangien und encystierten Zoosporen von *Phytophthora infestans*. Mit Hilfe des Modellsystems *Saccharomyces cerevisiae* konnte

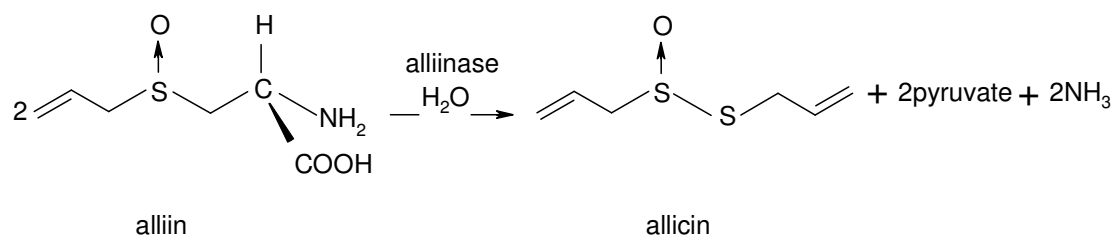
nachgewiesen werden, dass Allicin in Knoblauchsafte die Hefe-Zellen in einen oxidierten Zustand bringt und so Apoptose induziert. Dieses Ergebnis konnte auf zellulärer Ebene durch Experimente mit einem apoptose-spezifischen Fluoreszenzmarker, durch den aktive Caspasen nachgewiesen werden, die eine zentrale Rolle bei der Apoptose-Induktion spielen, bestätigt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand darin, grundlegende Fragen bezüglich eines gentechnischen Ansatzes zum Nutzen des antimikrobiellen Prinzips des Knoblauchs im Pflanzenschutz zu untersuchen. Dazu wurde eine cDNA der Alliinase aus Knoblauch durch RT-PCR kloniert und sowohl in Hefe als auch in *Arabidopsis thaliana* eingebracht. Obwohl das Protein in Hefe mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte, war hier keine Alliinase-Aktivität zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu konnte in *Arabidopsis* eine Aktivität detektiert werden und damit zum ersten Mal eine aktive Alliinase aus Knoblauch in transgenen Pflanzen synthetisiert werden. Untersuchungen zur Lokalisation der Alliinase, bei denen auch verschiedene potentielle Signalsequenzen getestet wurden, führten zu keiner endgültigen Aussage.

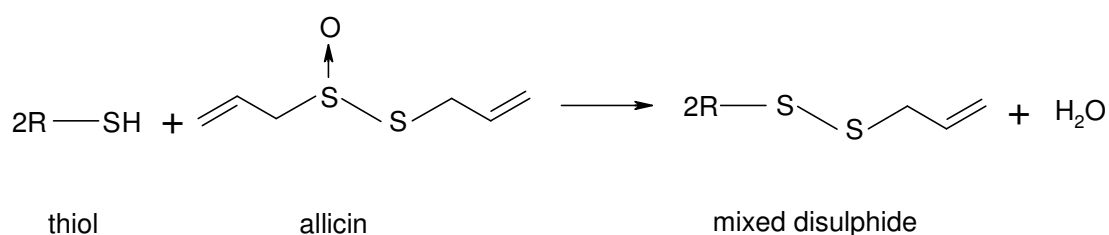
Eine Weiterentwicklung der gezeigten Einsatzmöglichkeiten von Knoblauch im Pflanzenschutz scheint sowohl im Hinblick auf eine Formulierung des Knoblauchsafte als auch hinsichtlich der Integration in Saatgutbehandlungen, insbesondere für die Anwendung unter Gewächshausbedingungen oder im Hobbygarten, interessant. Es sollte hierbei jedoch auch eine Kosten-Nutzen-Analyse durchgeführt werden. Zusätzlich wäre es möglich, einen gentechnischen Ansatz zu verfolgen, bei dem die Alliinasegen in Zielpflanzen eingebracht wird, um diese unter bestimmten Bedingungen resistenter gegenüber Pathogenen zu machen.

## 7 SUMMARY

The antimicrobial properties of garlic (*Allium sativum*), mainly due to the diallylthiosulfinate “Allicin”, have been known for centuries. Allicin is produced when garlic tissues are damaged and the substrate alliin (S-allyl-L-cysteine sulphoxide) mixes with the enzyme alliinase (EC 4.4.1.4).



Allicin is readily membrane permeable and undergoes thiol-disulphide exchange reactions with free thiol groups in proteins. It has been suggested that these properties are the basis of its antimicrobial action.



The objective of the present work was to contribute to the development of a garlic-based fungicide, including mode of action studies. Therefore, the effectiveness of allicin in garlic juice as a means of controlling plant disease was tested in model pathosystems including tomato / *Phytophthora infestans*, tomato / *Alternaria solani* and seed borne diseases such as carrot / *Alternaria* spp.. Successful protocols, often comparable with the effectivity of commercial treatments, were developed and preliminary experiments with formulations to enhance the long lasting activity were carried out. Initial field trials to assess the performance of allicin in garlic juice at controlling potato leaf blight were also carried out.

Investigations of the mode of action of allicin in garlic juice showed a clear reduction in germination and germ-tube growth of sporangia and cysts of *Phytophthora infestans*. Using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism it was demonstrated that allicin in garlic juice pushes the cells into an oxidized state where they entered into apoptosis. These results were confirmed at the cellular level using an apoptosis-specific fluorescent probe and confocal laser scanning microscopy to detect active caspases.

An additional objective of the present work was to clarify basic requirements mandatory for a genetic engineering approach. Therefore an alliinase cDNA was cloned from garlic by RT-PCR and expressed in yeast and in *Arabidopsis thaliana*. Although alliinase protein could be detected in yeast by Western blotting it was enzymatically inactive. However, activity was detected in *Arabidopsis* transformants as a first report of the expression of active alliinase in a transgenic plant species. Investigations, concerning the localization of the enzyme, including studies with different potential signal sequences of garlic alliinase, did not result in a final conclusion.

The results show that it appears to be worthwhile to further develop a strategy for using garlic or allicin as a plant protection agent especially for use under glasshouse conditions or in hobby gardening. However, further research work will be necessary to develop a garlic / allicin based plant protection concept including a cost / benefit analysis. In addition there is the possibility of employing a biotechnological approach incorporating the alliinase gene into target plants to assess if resistance to pathogens can be increased under appropriate circumstances.

## 8 LITERATUR

- ABBOTT, W.S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267
- AGRIOS, G.N. (2005) Plant Pathology (5<sup>th</sup>. Edition). *Elsevier Academic Press Inc., U.S.* (ISBN: 0-12-044565-4)
- ALI, M.; THOMSON, M.; AFZAL, M. (2000) Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 62 (2), 55-73
- ANDERSON, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 113, 548-555
- ANKRI, S.; MIRON, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. (1997) Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (10), 2286-2288
- ATKINS, P.W. (2002) Physikalische Chemie (3. Auflage). *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim* (ISBN 3-527-30236-0)
- BARHOOM, S.; SHARON, A. (2007) Bcl-2 proteins link programmed cell death with growth and morphogenetic adaptations in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Fung. Gen. Biol.* 44, 32-43
- BARTNICKI-GARCIA, S. (1973) Cell wall genesis in a natural protoplast: The zoospore of *Phytophthora palmivora*. In: Villanueva, J.R.; Garcia-Acha, I.; Gascon, S. and Uruburu, F.(Eds.): *Yeast. mould and plant protoplasts. Academic Press, London*, 77-91
- BECHTOLD, N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol. Biol. Genet.* 316; 1194-1199

- BETTIGA, M.; CALZARI, L.; ORLANDI, I.; ALBERGHINA, L.; VAI, M. (2004) Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res.* 5, 141-147
- BLAESER, P.; STEINER, U.; DEHNE, H.W. (2002) Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. *Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes (USL)* 97
- BLOCK, E. (1984) (E,Z)-Ajoene: A potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 8295-8296
- BLOCK, E. (1992) Die Organoschwefelchemie der Gattung *Allium* und ihre Bedeutung für die organische Chemie des Schwefels. *Angew. Chem.* 104, 1158-1203
- BRADFORD, K.J. (1986) Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hort. Science* 21 (5), 1105-1112
- BONIFACINO, J.S.; GLICK, B.S. (2004) The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166
- BRANDIZZI, F.; HANTON, S.; PINTO DASILVA, L.; BOEVINK, P.; EVANS, D.; OPARKA, K.; DENECKE, J.; HAWES, C. (2003) ER quality control can lead to retrograde transport from ER lumen to the cytosol and the nucleoplasm in plants. *Plant J.* 34, 269-281
- BRENNER, J.P. (1993) Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticid Sciene* 39, 95-102
- BUTTERWORTH, J.H.; MORGAN, E.D. (1968) Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *Chem. Comm. (London)*, 23-24
- CAMPBELL, N.A. (1997) *Biologie Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg (ISBN: 3-8274-0032-5)*
- CARMICHAEL, J.W. (1955) Lacto-fuchsin: A new medium for mounting fungi. *Mycologia* 47, 611

- CAVALLITO, C.J.; BAILEY, J.H. (1944) Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Am. Chem. Soc.* 66, 1944-1952
- CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. (1995) Substitution of chloroform by bromochloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal. Biochem.* 225; 163-164
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162; 156-159
- CIRIOLO, M.R. (2005) Redox control of apoptosis. *Antiox. Redox Sign.* 7 (3&4), 432-435
- COHEN, Y.; GISI, U. (2007) Differential activity of carboxylic acid amide fungicides against various developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 97, 1274-1283
- COLLATZ, K.G. (2001) Apoptose. *Lexikon der Biologie, Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg*
- CROFTS, A.J.; LEBORGNE-CASTEL, N.; HILLMER, S.; ROBINSON, D.G.; PHILLIPSON, B.; CARLSSON, L.E.; ASHFORD, D.A.; DENECKE, J. (1999) Saturation of the Endoplasmic Reticulum Retention Machinery Reveals Anterograde Bulk Flow. *Plant Cell* 11, 2233-2247
- CURTIS, H.; NOLL, U.; STÖRMANN, J.; SLUSARENKO, A.J. (2004) Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 65; 79-89
- DAMICONE, J. (2007) Fungicide resistance management. *Oklahoma Cooperative Extension Service (EPP-7663) (<http://osufacts.okstate.edu>)*
- DASILVA, L.L.P.; TAYLOR, J.P.; HADLINGTON, J.L., HANTON; S.L.; SNOWDEN, C.J.; FOX, S.J.; FORESTI, O.; BRANDIZZI, F.; DENECKE, J. (2005) Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* 17; 132-148
- DE BARY, H.A. (1876) Researches into the nature of the potato-fungus, *Phytophthora infestans*. *J. Bot.* 14; 105-126; *J. Roy. Agric. Soc. Engl. 2nd series* 12; 239-269

- DE BUCK, S.; DE WILDE, C.; VAN MONTAGU, M.; DEPICKER, A. (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breeding* 6, 459-468
- DENECKE, J.; BOTTERMANN, J.; DEBLAERE, R. (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 2, 51-59
- DENECKE, J.; VITALE, A. (1995) The use of protoplasts to study protein synthesis and transport by the plant endomembrane system. *Meth. Cell Biol.* 50, 335-348
- DESJARDINS, P.R.; ZENTMYER, G.A.; ZENTMYER, D.A. (1969) Electron microscopic observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Can. J. Bot.* 47; 1077-1079
- ELLMORE, G.S.; FELDBERG, R.S. (1994) Alliin Lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *Am. J. Bot.* 81(1), 89-94
- EVANS, D.A.; LAWSON, K.R. (1992) Crop protection chemicals - research and development perspectives and opportunities. *Pestic. Outlook* 3, 10-17
- FANNJIANG, Y.; CHENG, W.C.; LEE, S.J.; QI, B.; PEVSNER, J.; MCCAFFERY, J.M. (2004) Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.* 18, 2785-2797
- FITZPATRICK, H.M. (1930) The lower fungi. Phycomycetes. *McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London, 331pp.*
- GALINDO, J.; GALLEGLY, M.E. (1960) The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50, 123-128
- GOROG NEE PRIVITZER, K; KOCSIS NEE BAGYI, M.; OROSZ, G.; TOROK, T.; LASZLO, K.; TOTH, I.; BALOGH, K.; BODI, T.; GREGA NEE TOTH, E.; DOMBAY, Z.; NAGY, J.; PAVLISCSAK, C. (1988) Herbicide compositions containing a nitrile derivative as antidote. *US Patent 4787933*

- GRIFFITH, O. W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212
- HADDERS, J. (2006) *Alternaria*: A review of potato fields around the world. *PPO-Special Report No. 11*, 57-68
- HAN, J.; LAWSON, L.; CHU, T.C.; POTTER, D.; HAN, G.; HAN, P. (1993) Modification of catalytic properties of chicken liver fructose 1,6-bisphosphatase by Allicin. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 31 (6), 1007-1015
- HAN, J.; LAWSON, L.; HAN, G.; HAN, P. (1995) A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. *Anal. Biochem.* 225, 157-160
- HANAHAH, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 16, 557-580
- HAPPEL, N.; HÖNING, S.; NEUHAUS, J.M.; PARIS, N.; ROBINSON, D.G.; HOLSTEIN, E.H. (2004) *Arabidopsis*  $\mu$ A-adaptin interacts with the tyrosine motif of the vacuolar sorting receptor VSR-PS1. *Plant J.* 37, 678-693
- HARA-NISHIMURA, I.; SHIMADA, T.; HATANO, K.; TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, M. (1998) Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* 10 (5), 825-836
- HELLMUTH, K.; LAU, D.M.; BISCHOFF, F.R.; KÜNZLER, M.; HURT, E.C.; SIMOS, G. (1998) Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6374-6386
- HINZ, G.; HILLMER, S.; BÄUMER, M.; HOHL, I. (1999) Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *Plant Cell* 11 (8), 1509-1524
- HOFFMANN, G.M.; NIENHAUS, F.; POEHLING, H.M.; SCHÖNBECK, F.; WELTZIEN, H.C.; WILBERT, H. (1994) Lehrbuch der Phytomedizin (3 Auflage). *Blackwell Wissenschafts Verlag, Berlin*

- HONDA, Y.; SOTA, K.; NOZU, M. (1987) An ultrastructural study of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bull. Fac. Agr. 21*, 141-154
- HUH, G.H.; DAMSZ, B.; MATSUMOTO, T.K.; REDDY, M.P.; RUS, A.M.; IBEAS, J.I.; NARASIMHAN, M.L.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J. 29*, 649-659
- JACOB, C. (2006) A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat. Prod. Rep. 23*, 851-863
- JARVIS, P.; CHEN, L. J.; LI, H.; PETO, C. A.; FANKHAUSER, C.; CHORY, J. (1998) An *Arabidopsis* mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science 282*(5386), 100-103
- JENDE, G. (2001) Die Zellwand des Oomyceten *Phytophthora infestans* als Wirkort von Fungiziden. *Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*
- JENDE, G.; STEINER, U.; DEHNE, H.W. (1999) Effects of Iprovalicarb (SZX 0722) on the development of *Phytophthora infestans* in tomato plants. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 52 (1)*, 49-60
- JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; MADSEN, M.; JENSEN, D.F. (2004) Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp.. *Phytopathol. 94*(6), 551-560
- JERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer 26*, 239-257
- JEYARAJAN, R.; DORAISWAMI, R.; BHASKARAN, R.; JAYARAJ, S. (1986) Effect of Neem and other plant products in the management of plant disease in India. *Proc. 3rd. Int. Neem Conf., Nairobi*, 635-644
- JOLLIFFE, N.A.; CRADDOCK, C.P.; FRIGERIO, L. (2005) Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem. Soc. Transact. 33 (5)*, 1016-1018

- JONES, P.R.; MANABE, T.; AWAZUHARA, M.; SAITO, K. (2003) A new member of plant CS-lyases. *J. Biol. Chem.* 278 (12), 10291-10296
- KAST, K. (2005) Systemisch - kurativ – vorbeugend Wann wirkt welches Mittel besser gegen Peronospora. *Infodienst der Landwirtschaftsverwaltung Baden-Württemberg*
- KIRSCH, T.; PARIS, N.; BUTLER, J.M.; BEEVERS, L.; ROGERS, C. (1994) Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3403-3407
- KLINGAUF, F.; HERGER, G. (1985) Die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Echten Mehltau an Wintergerste, *Erysiphe graminis* f: sp. *hordei*. *Mededel. Fac. Landbouwwetenschap. Rijksuniv. Gent* 50 (2b), 270-274
- KONCZ, C.; SCHELL, J. (1986) The promotor of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by novel type *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396
- KONONOV, M.E.; BASSUNER, B.; GELVIN, S.B. (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11, 945-957
- KOOTER, J.M.; MATZKE, M.A.; MEYER, P. (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4, 340-347
- KREST, I. (2000) Entwicklung und Optimierung eines Alliin-Biosensors. *Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*
- KROEMER, G.; REED, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 6, 513-519
- KUETTNER, E.B.; HILGENFELD, R.; WEISS, M.S. (2002a) Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Arch. Biochem. Biophys.* 402, 192-200

- KUETTNER, E.B.; HILGENFELD, R.; WEISS, M.S. (2002b) The active principle of garlic at atomic resolution. *J. Biol. Chem.* 277 (48), 46402-46407
- LAKSHMANAN, P.; MOHAN, S.; JEYARAJAN, R. (1990) Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorus cucumeris*, the causal agent of collar rot disease of *Phaseolos aureus*. *Madras Agric. J.* 77 (1), 1-4
- LANCASTER, J.E.; COLLIN, H.A. (1981) Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci. Lett.* 2, 169-176
- LAWSON, L.D.; WOOD, S.G.; HUGHES, B.G. (1991) HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Med.* 57, 263-270
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; MATSUDAIRA, P. (2007) Molecular cell biology (6<sup>th</sup> Edition). *W.H. Freeman and Company, New York (ISBN: 0-7167-7601-4)*
- LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- LUDOVICO, P.; SOUSA, M.J.; SILVA, M.T.; LEO, C.; CORTE-REAL, M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiol.* 147, 2409-2415
- LÜTCKE, H. (1995) Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. *Eur. J. Biochem.* 228, 531-550
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 729-734
- MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; LIGR, M.; GREY, M.; SIGRIST, S.J.; WOLF, D.H.; FRÖHLICH, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 145, 757-767

- MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LÄCHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S.J.; WESSELBORG, S.; FRÖHLICH, K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9, 911-917
- MALIGA, P.S.; BREZNOVITIS, A.; MARTON, L. (1973) Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature New Biol.* 244; 29-30
- MASCLAUX, F.G.; GALAUD, J.P.; PONT-LEZICA, R. (2005) The riddle of the plant vacuolar sorting receptors. *Protoplasma* 226, 103-108
- MATSUOKA, K.; NEUHAUS, J.M. (1999) *Cis*-elements of protein transport to the plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* 50 (331), 165-174
- MENON, S. (1994) Smelly success for sorghum's saviour. *New Scientist* 1950, 22
- MEZA, T.J.; STANGELAND, B.; MERCY, I.C.; SKARN, M.; NYMOEN, D.A.; BERG, A.; BUTENKO, M.A.; HAKELIEN, A.M.; HASLEKAS, C.; MEZA-ZEPEDA, L.A.; AALEN, R.B. (2002) Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucl. Acids Research* 30 (20), 4556-4566
- MICHEL, A.; PETERSEN, J.; DOGAN, M.N.; ERNST, V. (1999) Anleitung zur Anlage und Auswertung von Versuchen zur Erstellung quantitativer Dosis-Wirkungsbeziehungen am Beispiel der Wirksamkeit von Herbiziden. *Gesunde Pflanzen* 51, 10-19
- MINET, M.; DUFOUR, M.E.; LACROUTE, F. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2(3), 417-422
- MIRON, T.; SHIN, I.; FEIGENBLAT, G.; WEINER, L.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. (2002) A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates. *Anal. Biochem.* 307, 76-83

- MISHRA, D.H.; MISHRA, D. (1990) Seed protectant property of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe. *Indian Perfumer* 34, 266-268
- MÜLHARDT, C. (2002) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Verlag*
- MÜLLER, K.O. (1929) Untersuchungen über die Kartoffelfäule und die Biologie ihres Erregers. *Arb. Biol. Reichsanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 16; 197-211
- NAGANAWA, R.; IWATA, N.; ISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; FUJINO, T.; SUZUKI, A. (1996) Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (11), 4238-4242
- NEES VON ESENBECK, C.G. (1817) Das System der Pilze und Schwämme. Ein Versuch. *Band 1, Würzburg*
- OOMMEN, S.; ANTO, R.J.; SRINIVAS, G.; KARUNAGARAN, D. (2004) Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur. J. Pharmac.* 485, 97-103
- ORTEGA, F.; STEINER, U., DEHNE, H.W. (1997) Use of fungicide-resistance for the characterisation and differentiation of *Venturia inaequalis* strains – suitability for competitiveness studies. In: Dehne, H.W.; Adam, G.; Dickmann, M.; Frahm, J.; Mauler-Machnik, A.; Van Haltern, P., *Developments in plant Pathology; Diagnosis and identification of plant pathogens (Vol. 11)*, Kluwer Academic Publishers, London, 329-332
- PATEL, A.V.; SLAATS, B.; HALLMANN, J.; TILCHER, R.; BEITZEN-HEINECKE, W.; VORLOP, K.D. (2004) Encapsulation and application of bacterial antagonists and a nematophagous fungus for biological pest control. In: Pedraz, J.L.; Orive G. & Poncelet, D. (Eds.), *Proc. of the 12th Intern. Workshop on Bioencapsulation, Vitoria, Spain, Servicio Editorial de la Univ. del Pais Vasco (ISBN: 84-8373-649-7)*, 137-140
- PETER, M.E.; KRAMMER, P.H. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10, 26-35

- PHILLIPSON, B.A.; PIMPL, P.; DASILVA, L.L.P.; CROFTS, A.J.; TAYLOR, J.P.; MOVAFEGHI, A.; ROBINSON, D.G.; DENECKE, J. (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* 13, 2005-2020
- PIMPL, P.; HANTON, S.L.; TAYLOR, J.P.; PINTO-DASILVA, L.L.; DENECKE, J. (2003) The GTPase ARF1 controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* 15, 1242-1256
- PORTZ, D.; NOLL, U.; SLUSARENKO, A.J. (2005) Allicin from garlic (*Allium sativum* L.): A new look at an old story. In: Dehne, H.W.; Gisi, U.; Kuck, K.H.; Russell, P.E.; Lyr, H. (Eds.), *Proc. of the 14th Intern. Reinhardsbrunn Symposium, Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*, Alton, UK: British Crop Production Council, 227-234
- PORTZ, D.; KOCH, E.; SLUSARENKO, A.J. (2008) Effects of garlic (*Allium sativum* L.) juice containing allicin on *Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) and on downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev. *Eur. J. Plant Pathol.* (in press)
- RABINKOV, A.; MIRON, T.; KONSTANTINOVSKI, L.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D.; WEINER, L. (1998) The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochem. Biophys. Acta (Protein structure)* 1379, 233-244
- RABINKOV, A.; ZHU, X.-Z.; GRAFI, G.; GALINI, G.; MIRELMAN, D. (1994) Alliin Lyase (Alliinase) from garlic (*Allium sativum*). Biochemical characterization and cDNA cloning. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48(3), 149-171
- RAMANATHAN, V.; VELUTHAMBI, K. (1995) Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28, 1149-154
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (2000) *Biologie der Pflanzen* (3. Auflage) De Gruyter Verlag, Berlin – New York (ISBN: 3-11-015462-5)

- REIMERS, F.; SMOLKA, S.E.; WERRES, S.; PLANK-SCHUMACHER, K.; WAGNER, G. (1993) Effect of ajoene, a compound derived from *Allium sativum*, on phytopathogenic and epiphytic micro-organisms. *J. Plant Dis. Prot.* 100 (6), 622-633
- ROBERTSON, N.F. (1991) The challenge of *Phytophthora infestans*. In: Ingram, D.J. & Williams, P.H. (Eds.): *Phytophthora infestans, the cause of late blight potato. Advances in Plant Pathology, Vol. 7, Academic Press London, 1-30*
- ROVESTI, L. S.; MARCO, D. I.; PANCALDI, D. (1992) Effect of neem kernel extract on some phytopathogenic fungi under greenhouse conditions. *Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* 99, 293-296
- RUBY, S.W.; CHANG, T.H.; ABELSON, J. (1993) Four yeast spliceosomal proteins (PRP8, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-mRNA. *Genes & Dev.* 7, 1909-1925
- RUSSEL, P.E.; MUSSA, A.E.A. (1977) The use of garlic (*Allium sativum*) extracts to control foot rot of *Phaseolus vulgaris* caused by *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. *Ann. appl. Biol.* 86, 369-372
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; EHRLICH, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 487-491
- SANBLAS, G.; SANBLAS, F.; GIL, F.; MARINO, L.; APITZ-CASTRO, R. (1989) Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1641-1644
- SANDERFOOT, A.A.; RAIKHEL, N.V. (2003) The secretory system of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book (Amer. Soc. Plant Biol.)*
- SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. (1999) Strobilurine: Evolution einer neuen Wirkstoffklasse. *Angew. Chemie* 111 (10), 1416-1438

- SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad. Biol. Med.* 30 (11), 1191-1212
- SCHÖBER-BUTIN, B. (2001) Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger *Phytophthora infestans* (MONT.) DE BARY. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft; Heft 384*
- SCHWIMMER, S.; MAZELIS, M. (1963) Characterization of Alliinase of *Allium cepa* (onion). *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 66-73
- SCOTT, A.; WYATT, S.; TSOU, P.L.; ROBERTSON, D.; ALLEN, N.S. (1999) Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *Biotechniques* 26, 1125-1132
- SEMMLER, F.W. (1892) Über das ätherische Öl des Knoblauchs (*Allium sativum*). *Arch. Pharm.* 230, 434-443
- SHIROGANE, T.; FUKADA, T.; MULLER, J.M.; SHIMA, D.T.; HIBI, M.; HIRANO, T. (1999) Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709-719
- SINGH, U.P.; PANDEY, V.N.; WAGNER, K.G.; SINGH, K.P. (1990) Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic. (*Allium sativum*). *Can. J. Bot.* 68, 1354-1356
- SINGH, U.P.; CHAUHAN, V.B. (1992) Effect of ajoene, a compound derived from garlic (*Allium sativum*), on *Phytophthora drechsleri* f.sp. *cajani*. *Mycologia* 84 (1), 105-108
- SLUSARENKO, A.J.; PATEL, A.; PORTZ, D. (2008) Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur. J. Plant Pathol.* (in press)
- STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Ann. Bot.* 79, 3-12

- STOLL, A.; SEEBECK, E. (1949) Über den enzymatischen Abbau des Alliins und die Eigenschaften der Alliinase. *Helv. Chim. Acta* 32, 197-205
- STRUCK, C.; HAHN, M.; MENDGEN, K. (1998) Infection structures of plant pathogenic fungi-potential targets for plant disease control. *Zeitsch. f. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz* 105 (6), 581-589
- SUN, L.; WANG, X. (2003) Effects of Allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J. Gastroenterol.* 9 (9), 1930-1934
- THELEN, M.; WYMANN, M.P.; LANGEN, H. (1994) Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signalling in neutrophil leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4960-4964
- THOMMA, B.P.H.J. (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4 (4), 225-236
- UESUGI, Y. (1998) Fungicide classes: Chemistry, uses and mode of action. In: *Huston D.H. & Miyamoto, J. (Eds.), Fungicidal activity, John Wiley and Sons Inc., New York (USA), 23-56*
- ULLRICH, J.; SCHÖBER, B. (1972) Zoosporenzahl und Sporangiengröße bei *Phytophthora infestans* (mont.) de Bary. *Phytopathol. Z.* 74; 268-271
- VAN DAMME, E.J.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, P.J. (1992) Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic. *Eur. J. Biochem.* 209 (2), 751-757
- VAN LAREBEKE, N.; ENGLER, G.; HOLSTER, M.; VAN DEN ELSACKER, S.; ZAENEN, J.; SCHILPEROORT, R.A.; SCHELL, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170
- VON ARNIM, A.G.; DENG, X.W.; STACEY, M.G. (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221, 35-43

- VON ARX, J.A. (1968) Pilzkunde. *Cramer Verlag, Lehre*
- WEBSTER, J. (1983) Pilze. Eine Einführung. *Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York; 641 S.*
- WEIK, R.; FRANCKY, A.; STRIEDNER, G.; RASPOR, P.; BAYER, K.; MATTANOVICH, D. (1998) Recombinant expression of Alliin Lyase from garlic (*Allium sativum*) in bacteria and yeasts. *Planta Med.* 64, 387-388
- WENCK, A.; CZAKO, M.; KANEVSKI, I.; MARTON, L. (1997) Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34, 913-922
- WERTHEIM, T. (1844) Untersuchung des Knoblauchöls. *Ann. Chem. Pharm.* 51, 289-315
- WILFINGER, W.W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22; 474-481
- YAMAZAKI, M.; SUGIYAMA, M.; SAITO, K. (2002) Intercellular localization of cysteine synthase and Alliinase in bundle sheaths of *Allium* plants. *Plant Biotechn.* 19(19), 7-10
- YANG, Y.D.; ELAMAWI, R.; BUBECK, J.; PEPPERKOK, R.; RITZENTHALER, C.; ROBINSON, D.G. (2005) Dynamics of COPII vesicles and the golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2 cells provides evidence for transient association of golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell* 17, 1513-1531
- YOSHIDA, S.; KASUGA, S.; HAYASHI, N.; USHIROGUCHI, T.; MATSUURA, H.; NAKAGAWA, S. (1987) Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (3), 615-617
- ZHANG, Z.M.; ZHONG, N.; GAO, H.Q.; ZHANG, S.Z.; WEI, Y.; XIN, H.; MEI, X.; HOU, H.S.; LIN, X.Y.; SHI, Q. (2006) Inducing apoptosis and upregulation of Bax and Fas ligand expression by Allicin in hepatocellular carcinoma in Balb/c nude mice. *Chin. Med. J.* 119 (5), 422-425

# ANHANG 1

## Alliinase cDNA nach VAN DAMME *et al.* (1992)

### TS-L / TS2

```

1  aattaattag ctatgggtgga gtcttacaaa aaaattggca gttgtaataa aatgccatgc
61  ctagtgattt tgacatgcat tatcatgtct aattcacttg ttaacaataa taatatggtt
121 caagcgaaga tgacatggac tatgaaggca gcagaagagg cagaggcggg ggctaataa
181 aactgttcag agcatggaag agcttttctg gatggaatta tttcggaggg ctctcctaaa
241 tgcgagtgca aacttgcta caccgggccg gattgctctg aaaagatcca aggttgctct
301 gctgatgttg ccagcgggta cggactgttc ctagaggaat actggaagca gcacaaggaa
361 gccagtgcag tgctggttcc accatggcac agaatgagct actttttcaa ccagtcagc
421 aatttcatat ctttcgagct tgaaaaaaca attaaagaac tacacgaggt agtgggaaat
481 gctgctgcaa aggacaggtta cattgtgttt ggagtagggg tcaactcaact catccatgga
541 ctctgcatct ctctttcacc aaatatgact gccactcccg acgaccaga atctaaagtt
601 gttgctcatg ccccttttta tccgggtgtc agagaacaaa caaatatctt taacaagaaa
661 ggatacgtgt gggccgaaa tgcagccaat tacgtgaacg tttcaaacc ccagcagtat
721 attgagatgg ttacttcacc taataacccc gaaggtctgc ttcgccatgc agtaatcaag
781 ggatgcaaat ccatttacga tatggtttac tactggcctc attacacccc aatcaagtac
841 aaagccgatg aagatatctt gctggttaca atgtctaaat tcaactggaca ctctggtagt
901 cgatttgggt gggcgttgat aaaggatgaa tctgtgtata ataacttgtt gaattacatg
961 acaaagaaca cagagggcac gccgcgtgaa acacaactac gatcgctcaa agttctaaag
1021 gaagttgtag caatggtgaa aacgcagaaa ggcaccatgc gtgacctcaa cacattcggg
1081 tttaagaaac taagggagag atgggtcaat atcaactgcac tactcgatca gtccgacaga
1141 ttctcctatc aagagcttcc tcaaagcgaa tactgcaatt acttcagaag aatgagacct
1201 ccatcccat cttatgcatg ggtgaagtgt gaatgggaag aagacaaaga ttgctaccag
1261 acatttcaga atggacgtat caacacacia aatggagtgg gttttgaagc tagcagtcgt
1321 tacgtgctgt tgagtttgat caagacacag gatgattttg atcaactcat gtactatctg
1381 aaggatatgg ttaaagcaaa gaggaagact cctctcatca aacaactttt cattgatcag
1441 accgagacgg cctcccgctg tcctttcatt taagtactcg tgtcatgtat ttctctgctg
1501 ttttgtagt gtacgacat gctcatacat cctaagtcta cggcagtaag gagtatcttt
1561 ctatgaaata aataaagtat gacattgtat cggctgctat atgattttgt aataaaatat
1621 gcattttcat gtttgaacat ttattgtat attacaacia tgcacagat tacaagaata
1681 tacagagtat aatgaatat tacacagaaa tatcagagat ttaaattaca tttaaatata
1741 tcgacagcga aaataatata atacacaact agaagtagat atacggatac aaagctttcc
1801 ggatatcatt ccagctgtaa accagatcc tgtgaatata aatctgcaaa accaaaacta
1861 ctagatatag ctatcctagc tccacggctc tccatttgca gaagtcttca tcctatcgca
1921 tcttcg

```

     = Sequenz für putatives Signalpeptid

xy = Sequenz für putatives Signalpeptid + 10 zusätzl. Aminosäuren

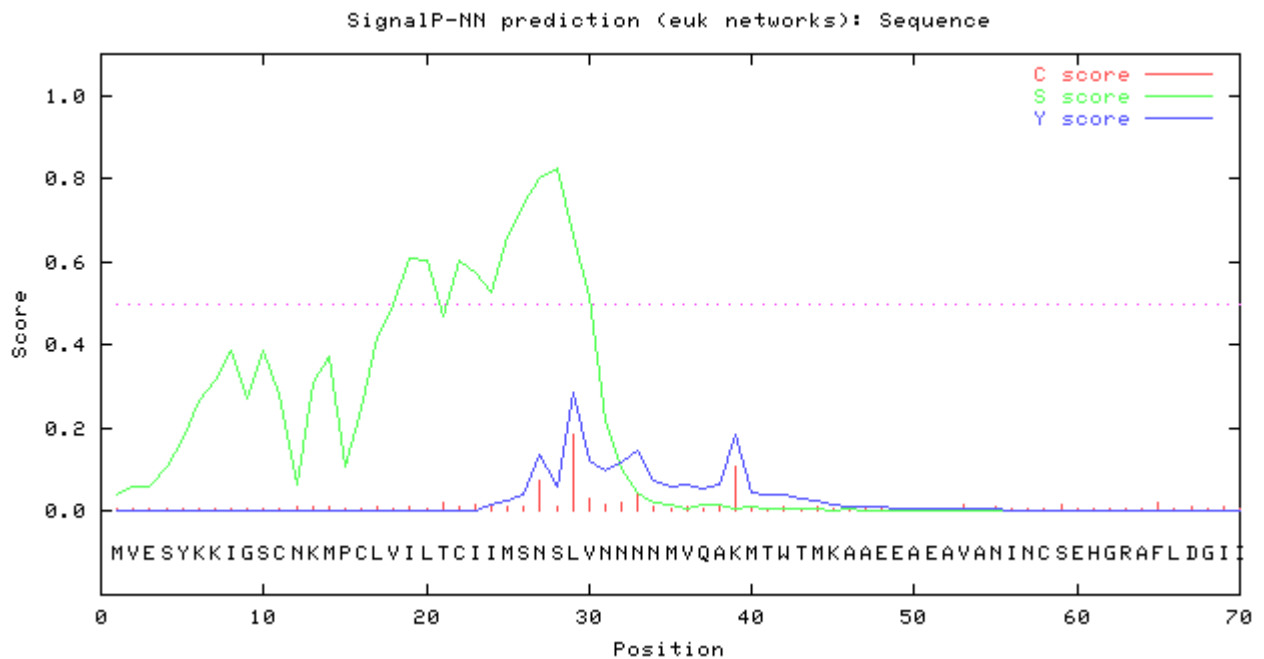
     = RNA-Sonde      xy = Start und Ende der Alliinase-Sequenz

**Aminosäure-Sequenz nach VAN DAMME *et al.* (1992)**

MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCSIIMSNSLVN>NNNMVQAKMTWTMKAEEAEAVANINC  
 SEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGC SADVASGDGLFLEEYWKQHKE  
 ASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAAKDRYIVFGVGV TQLI  
 HGLV I SLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPV FREQTKYFNKKG YVWAGNAANYVNVSN  
 PEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP I KYKADED ILLFTMSKF  
 TGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGT  
 MRDLNTFGFKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSPSYAWK C  
 EWEEKDCYQTFQNGRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYL KDMVKAKR  
 KTPLIKQLFIDQ TETASRRPFI

- = putatives Signalpeptid
- = zusätzliche 10 Aminosäuren

**SignalP-NN Ergebnis (Vorhersage der Schnittstelle eines Signalpeptids):**



**TargetP Ergebnis (Vorhersage der subzellulären Lokalisation):**

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	486	0.008	0.038	0.931	0.215	S	2
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

**Loc** → Lokalisation

**C** → Chloroplast, d.h. die Sequenz beinhaltet ein cTP, ein Chloroplasten-Transitpeptid

**M** → Mitochondrium, d.h. die Sequenz beinhaltet ein mTP, ein mitochondriales Transitpeptid

**S** → Sekretorischer Weg, d.h. die Sequenz beinhaltet ein SP, ein Signalpeptid

**\_** → jede andere Lokalisation

Die Lokalisation mit der höchsten "Punktzahl" ist die Wahrscheinlichste.

Es gibt Zuverlässigkeitsklassen (RC) von 1 bis 5, wobei 1 die zuverlässigste Voraussage ist.

## ANHANG 2

### Alliinase cDNA nach RABINKOV *et al.* (1994)

1 aggcatgccca ttttattaca actgcccaatt tttttgtaag actccacccat agccaattaa

**TS-K**

61 ttagctttgct tagctatgga tatataa**atg atctgcctag tgat**tttgac **atgcattatc**  
 121 **atgtctaatt ca**ttttgtaa caataataat atggttcaag cgaag**atg**ac atggactatg  
 181 aaggcagcag aagaggcaga ggoggtggct aatataaact gttcagagca tggaaagagct  
 241 tttctggatg gaattatttc ggagggctct cctaaatgcg agtgcaacac ttgctacacc  
 301 ggtccggatt gctctgaaaa gatccaaggt tgctctgctg atggtgccag tggtgacgga  
 361 ctgtttctag aggaatactg gaagcagcac aaggaagcca gtgcagtgct ggtttcacca  
 421 tggcaccgaa tgagctactt tttcaaccca gtcagcaatt tcatatcttt cgagcttgaa  
 481 aaaacaatta aagaactaca cgaggtagtg ggaaatgctg ctgcaaagga caggtacatt  
 541 gtgtttggag taggggtcac tcaactcatc catggactcg tcatctctct ttcaccaa  
 601 atgactgccca ctcccagcgc accagaatct aaagtgtgtg ctcatgcccc tttttatccg  
 661 gtgttcagag aacaaacaaa atattttgac aagaaaggat acgtgtgggc cggaaaatgca  
 721 gcccaattacg tgaacgtttc aaaccagag cagtatattg agatggttac ttcaccta  
 781 aaccacagaag gtctgcttcg ccatgcagta atcaagggat gcaaatccat ttacgatatg  
 841 gtttactact ggcctcatta caccccaatc aagtacaaag cccgatgaaga tatcttgctg  
 901 tttacaatgt ctaaattcac tggacactct ggtagtcgat ttgggtgggc gttgataa  
 961 gatgaatctg tgtataataa cttgttgaat tacatgacaa agaatacggga gggcacgcct  
 1021 cgtgaaacac aactacgatc gctcaaagtt ctaaaggaaa ttgtagcaat ggtgaaaacg  
 1081 caaaaaggca ccatgcgtga cctcaacaca ttcggtttta agaaactaag ggagagatgg  
 1141 gtcaatatca ctgcactgct cgatcagtcg gacagattct cctatcaaga gcttcctcaa  
 1201 agcgaatact gcaattactt cagaagaatg agacctccat ccccatctta tgcattgggtg  
 1261 aactgcgaat gggagaaga caaagattgc taccagacat ttcagaatgg acgatcaac  
 1321 acacaaagtg gagtgggttt tgaagctagc agtcggttac tgcgtttgag tttgatcaag  
 1381 acacaggatg attttgatca actcatgtac tatttgaagg atatggttaa agcaaagagg  
 1441 aagactcctc tcataaaaca acttttact gatgagaccg agacggcctc ccgctcgtcct  
 1501 ttcatt**taa**g tactcgtgtc atgtatttct ctgctgtttg ttagtgtacg accatgctca  
 1561 tacatcctaa tgctacggca gtaaggagta tctttgtatg caataaataa agtatgacat  
 1621 tgtatcggct gctatatgat tttgtaataa aatatgagac tttgctaaaa aaaaaaaaaa  
 1681 aaaaaaaaaa aaaatcgaca gcagg

       = Sequenz für putatives Signalpeptid

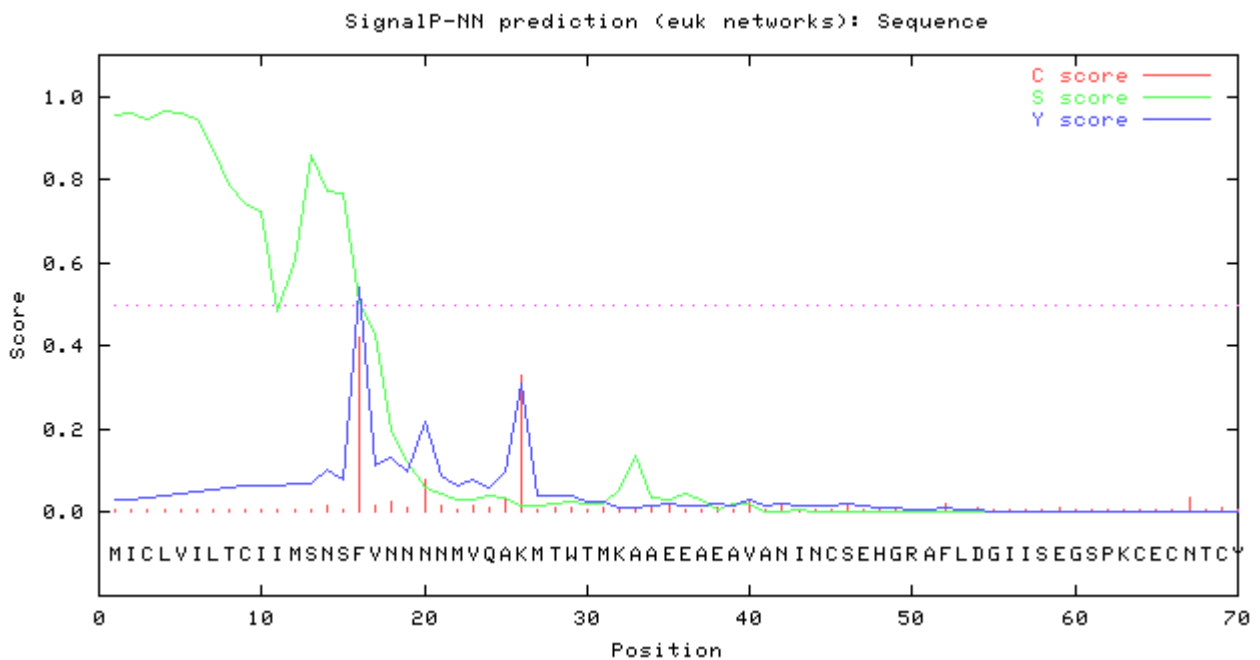
**xy** = Start und Ende der Alliinase-Sequenz

## Aminosäure-Sequenz nach RABINKOV *et al.* (1994)

**MICLVILTCIIMSNS**FVNNNNMVQAKMTWTMKAAEEAEAVANINCSEHGRAFLDGIIS  
 EGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMS  
 YFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAAKDRYIVFGVGVGTQLIHGLVISLSPNMTA  
 TPDAPESKVVAHAPFYVPVFREQTQKYFDKKGIVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSINN  
 PEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALI  
 KDESVINLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEIVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKLR  
 ERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFYFRMRPPSPSYAWVNCEWEEDKDCYQTFQ  
 NGRINTQSGVGFESSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYLKDMMVKAKRKTPLIKQLFTDET  
 ETASRRPFI

**■** = putatives Signalpeptid

## SignalP-NN Ergebnis (Vorhersage der Schnittstelle eines Signalpeptids):



## TargetP Ergebnis (Vorhersage der subzellulären Lokalisation):

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	473	0.379	0.049	0.651	0.102	S	4
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000		

**Loc** → Lokalisation

**C** → Chloroplast, d.h. die Sequenz beinhaltet ein cTP, ein Chloroplast-Transitpeptid

**M** → Mitochondrium, d.h. die Sequenz beinhaltet ein mTP, ein mitochondriales Transitpeptid

**S** → Sekretorischer Weg, d.h. die Sequenz beinhaltet ein SP, ein Signalpeptid

**\_** → jede andere Lokalisation

Die Lokalisation mit der höchsten "Punktzahl" ist die Wahrscheinlichste.

Es gibt Zuverlässigkeitsklassen (RC) von 1 bis 5, wobei 1 die zuverlässigste Voraussage ist.

## ANHANG 3

### Vergleich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten und veröffentlichter Alliinase-cDNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen

Die Nummerierung entspricht der Bezeichnung der *E. coli*-Klone.

#### cDNA-Sequenz

Al#1	ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA	60
VanDamme	ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA	60
Rabinkov	ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA	60
	*****	
Al#1	GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC	120
VanDamme	GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC	120
Rabinkov	GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC	120
	*****	
Al#1	AACACTTGCTACACCGGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT	180
VanDamme	AACACTTGCTACACCGGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT	180
Rabinkov	AACACTTGCTACACCGGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT	180
	*****	
Al#1	GCCAGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAAGGAAGCCAGTGCA	240
VanDamme	GCCAGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAAGGAAGCCAGTGCA	240
Rabinkov	GCCAGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAAGGAAGCCAGTGCA	240
	*****	
Al#1	GTGCTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA	300
VanDamme	GTGCTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA	300
Rabinkov	GTGCTGGTTTCACCATGGCACCCAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA	300
	*****	
Al#1	TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA	360
VanDamme	TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA	360
Rabinkov	TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA	360
	*****	
Al#1	AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC	420
VanDamme	AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC	420
Rabinkov	AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC	420
	*****	

```

Al#1          TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480
VanDamme     TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480
Rabinkov     TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480
*****

Al#1          GCCCCTTTTTATCCGGTGTTTACAGAGAACAAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTG 540
VanDamme     GCCCCTTTTTATCCGGTGTTTACAGAGAACAAACAAAATATTTTAAACAAGAAAGGATACGTG 540
Rabinkov     GCCCCTTTTTATCCGGTGTTTACAGAGAACAAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTG 540
*****

Al#1          TGGGCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
VanDamme     TGGGCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
Rabinkov     TGGGCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
*****

Al#1          GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
VanDamme     GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
Rabinkov     GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
*****

Al#1          TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
VanDamme     TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
Rabinkov     TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
*****

Al#1          GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
VanDamme     GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
Rabinkov     GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
*****

Al#1          TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAAC 840
VanDamme     TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAAC 840
Rabinkov     TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAAT 840
*****

Al#1          ACGGAGGGCACGCCTCGTGAACACAGCTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTA 900
VanDamme     ACAGAGGGCACGCCGCGTGAACACAACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTA 900
Rabinkov     ACGGAGGGCACGCCTCGTGAACACAACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAATTGTA 900
** *****

Al#1          GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
VanDamme     GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
Rabinkov     GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
*****
    
```

```
Al#1          CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTACTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
VanDamme     CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTACTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
Rabinkov     CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
*****

Al#1          CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
VanDamme     CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
Rabinkov     CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
*****

Al#1          TCTTATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
VanDamme     TCTTATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
Rabinkov     TCTTATGCATGGGTGAACTGCGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
*****

Al#1          AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
VanDamme     AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
Rabinkov     AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
*****

Al#1          TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
VanDamme     TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
Rabinkov     TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
*****

Al#1          GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACTTTTCATTGATCAGACCGAGACG 1320
VanDamme     GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACTTTTCATTGATCAGACCGAGACG 1320
Rabinkov     GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATAAACAACTTTTCATTGATGAGACCGAGACG 1320
*****

Al#1          GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAACTGCAGAATCACTA 1358
VanDamme     GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAA----- 1344
Rabinkov     GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAA----- 1344
*****
```

**Aminosäure-Sequenz**

Al#1	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60
VanDamme	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60
Rabinkov	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60 *****
Al#1	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120
VanDamme	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120
Rabinkov	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120 *****
Al#1	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFDKKG YV 180
VanDamme	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFNKKG YV 180
Rabinkov	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFDKKG YV 180 *****:*****
Al#1	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240
VanDamme	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240
Rabinkov	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240 *****
Al#1	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVV 300
VanDamme	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVV 300
Rabinkov	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEIV 300 *****:*
Al#1	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360
VanDamme	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360
Rabinkov	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360 *****
Al#1	SYAWVKCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420
VanDamme	SYAWVKCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420
Rabinkov	SYAVNCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQSGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420 *****:*****.*****
Al#1	VKAKRKTPLIKQLFIDQTETASRRPFI-LQNH 451
VanDamme	VKAKRKTPLIKQLFIDQTETASRRPFI----- 447
Rabinkov	VKAKRKTPLIKQLFTDETETASRRPFI----- 447 ***** *:*****

**cDNA-Sequenz**

Al#6 ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA 60  
Rabinkov ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA 60  
VanDamme ATGACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTCA 60  
\*\*\*\*\*

Al#6 GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC 120  
Rabinkov GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC 120  
VanDamme GAGCATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGC 120  
\*\*\*\*\*

Al#6 AACACTTGCTACACCGGTCCAGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT 180  
Rabinkov AACACTTGCTACACCGGTCCAGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT 180  
VanDamme AACACTTGCTACACCGGTCCAGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGGTTGCTCTGCTGATGTT 180  
\*\*\*\*\*

Al#6 GCCAGTGGTGACGGACTGTTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCA 240  
Rabinkov GCCAGTGGTGACGGACTGTTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCA 240  
VanDamme GCCAGTGGTGACGGACTGTTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCA 240  
\*\*\*\*\*

Al#6 GTGCTGGTTTCACCATGGCACCGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA 300  
Rabinkov GTGCTGGTTTCACCATGGCACCGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA 300  
VanDamme GTGCTGGTTTCACCATGGCACCGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATA 300  
\*\*\*\*\*

Al#6 TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA 360  
Rabinkov TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA 360  
VanDamme TCTTTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCA 360  
\*\*\*\*\*

Al#6 AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC 420  
Rabinkov AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC 420  
VanDamme AAGGACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCCTCAACTCATCCATGGACTCGTCATC 420  
\*\*\*\*\*

Al#6 TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480  
Rabinkov TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480  
VanDamme TCTCTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCAT 480  
\*\*\*\*\*

Al#6 GCCCCTTTTTATCCGGTGTTCAGAGAACAACAATAATTTTGACAAGAAAGGATACGTG 540  
Rabinkov GCCCCTTTTTATCCGGTGTTCAGAGAACAACAATAATTTTGACAAGAAAGGATACGTG 540  
VanDamme GCCCCTTTTTATCCGGTGTTCAGAGAACAACAATAATTTTAACAAGAAAGGATACGTG 540  
\*\*\*\*\*

```

Al#6          TGGGCCGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
Rabinkov     TGGGCCGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
VanDamme     TGGGCCGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATG 600
*****

Al#6          GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
Rabinkov     GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
VanDamme     GTTACTTCACCTAATAACCCAGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAA 660
*****

Al#6          TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
Rabinkov     TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
VanDamme     TCCATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGAT 720
*****

Al#6          GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
Rabinkov     GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
VanDamme     GAAGATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCAGTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGG 780
*****

Al#6          TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAAATTGTTGAATTACATGACAAAGAAC 840
Rabinkov     TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAAATTGTTGAATTACATGACAAAGAAT 840
VanDamme     TGGGCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAAATTGTTGAATTACATGACAAAGAAC 840
*****

Al#6          ACGGAGGGCAGCCTCGTGAAACACAGCTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTA 900
Rabinkov     ACGGAGGGCAGCCTCGTGAAACACAGCTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTA 900
VanDamme     ACAGAGGGCAGCCTCGTGAAACACAGCTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTA 900
** *****

Al#6          GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
Rabinkov     GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
VanDamme     GCAATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTTCGGTTTTAAGAAA 960
*****

Al#6          CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
Rabinkov     CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
VanDamme     CTAAGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTAT 1020
*****

Al#6          CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
Rabinkov     CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
VanDamme     CAAGAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCA 1080
*****
    
```

```
Al#6      TCTTATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
Rabinkov  TCTTATGCATGGGTGAACTGCGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
VanDamme  TCTTATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAG 1140
          ***** ** *****

Al#6      AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
Rabinkov  AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
VanDamme  AATGGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGT 1200
          ***** *****

Al#6      TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
Rabinkov  TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
VanDamme  TTGAGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATG 1260
          *****

Al#6      GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACTTTTCACTGATCAGACCGAGACG 1320
Rabinkov  GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATAAAACAACTTTTCACTGATGAGACCGAGACG 1320
VanDamme  GTTAAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACTTTTCATTGATCAGACCGAGACG 1320
          ***** ***** **** *****

Al#6      GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAACTGCAGAATCACTA 1358
Rabinkov  GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAA----- 1344
VanDamme  GCCTCCCGTCGTCCTTTCATTTAA----- 1344
          *****
```

**Aminosäure-Sequenz**

Al#6	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60
VanDamme	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60
Rabinkov	MTWTMKAEEEEAEAVANINCSEHGRAFLDGI ISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADV 60 *****
Al#6	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120
VanDamme	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120
Rabinkov	ASGDGLFLEEYWKQHKEASAVLVSPWHRMSYFFNPVSNF ISFELEKTIKELHEVVGNAAA 120 *****
Al#6	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFDKKG YV 180
VanDamme	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFNKKG YV 180
Rabinkov	KDRYIVFGVGTQLIHGLVISLSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYVPVRFREQTKYFDKKG YV 180 *****:*****
Al#6	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240
VanDamme	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240
Rabinkov	WAGNAANYVNVSNPEQYIEMVTSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTP IKYKAD 240 *****
Al#6	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVV 300
VanDamme	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVV 300
Rabinkov	EDILLFTMSKFTGHSGSRFGWALIKDES VYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEIV 300 *****:*
Al#6	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360
VanDamme	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360
Rabinkov	AMVKTQKGTMRDLNTFGFKLRERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCN YFRMRPPSP 360 *****
Al#6	SYAWVKCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420
VanDamme	SYAWVKCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420
Rabinkov	SYAVNCEWEEDKDCYQTFQNGRINTQSGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDM 420 *****:*****.*****
Al#6	VKAKRKTPLIKQLFTDQTETASRRPFI-LQNH 451
VanDamme	VKAKRKTPLIKQLFIDQTETASRRPFI----- 447
Rabinkov	VKAKRKTPLIKQLFTDETETASRRPFI----- 447 ***** *:*****

**cDNA-Sequenz**

```

Al+TS2#3      ATGGTGGAGTCTTACAAAAAATTGGCAGTTGTAATAAAATGGCATGCCTAGTGATTTTG 60
VanDamme      ATGGTGGAGTCTTACAAAAAATTGGCAGTTGTAATAAAATGCCATGCCTAGTGATTTTG 60
Rabinkov      -----ATGATCTGCCTAGTGATTTTG 21
                                     ***      *****

Al+TS2#3      ACATGCATTATCATGTCTAATTCATTTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 120
VanDamme      ACATGCATTATCATGTCTAATTCACCTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 120
Rabinkov      ACATGCATTATCATGTCTAATTCATTTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 81
*****

Al+TS2#3      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAGACTGTTTCAGAG 180
VanDamme      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTTCAGAG 180
Rabinkov      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTTCAGAG 141
*****

Al+TS2#3      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 240
VanDamme      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 240
Rabinkov      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 201
*****

Al+TS2#3      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 300
VanDamme      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 300
Rabinkov      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 261
*****

Al+TS2#3      AGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 360
VanDamme      AGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 360
Rabinkov      AGTGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 321
** *****

Al+TS2#3      CTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 420
VanDamme      CTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 420
Rabinkov      CTGGTTTCACCATGGCACCGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 381
*****

Al+TS2#3      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 480
VanDamme      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 480
Rabinkov      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 441
*****

Al+TS2#3      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 540
VanDamme      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 540
Rabinkov      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 501
*****

```

```

Al+TS2#3      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 600
VanDamme      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 600
Rabinkov      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 561
*****

Al+TS2#3      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTGTGG 660
VanDamme      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTAACAAGAAAGGATACGTGTGG 660
Rabinkov      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTGTGG 621
*****

Al+TS2#3      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 720
VanDamme      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 720
Rabinkov      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 681
*****

Al+TS2#3      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 780
VanDamme      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 780
Rabinkov      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 741
*****

Al+TS2#3      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 840
VanDamme      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 840
Rabinkov      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 801
*****

Al+TS2#3      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 900
VanDamme      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 900
Rabinkov      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 861
*****

Al+TS2#3      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAACACA 960
VanDamme      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAACACA 960
Rabinkov      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAATACG 921
*****

Al+TS2#3      GAGGGCACGCCCGGTGAAACACAACACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTAGCA 1020
VanDamme      GAGGGCACGCCCGGTGAAACACAACACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTAGCA 1020
Rabinkov      GAGGGCACGCCCTCGTGAAACACAACACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAATTTGTAGCA 981
*****

Al+TS2#3      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1080
VanDamme      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1080
Rabinkov      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1041
*****

```

```

Al+TS2#3      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTACTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1140
VanDamme      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTACTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1140
Rabinkov      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1101
*****

Al+TS2#3      GAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1200
VanDamme      GAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1200
Rabinkov      GAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1161
*****

Al+TS2#3      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1260
VanDamme      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1260
Rabinkov      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1221
*****

Al+TS2#3      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1320
VanDamme      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1320
Rabinkov      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1281
*****

Al+TS2#3      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1380
VanDamme      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1380
Rabinkov      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1341
*****

Al+TS2#3      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACCTTTTCACTGATCAGACCGAGACGGCC 1440
VanDamme      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACCTTTTCACTGATCAGACCGAGACGGCC 1440
Rabinkov      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATAAAACAACCTTTTCACTGATGAGACCGAGACGGCC 1401
*****

Al+TS2#3      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAACTGCAGAATCACTAG 1476
VanDamme      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAA----- 1461
Rabinkov      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAA----- 1422
*****

```

**Aminosäure-Sequenz**

Al+TS2#3	MVESYKKIGSCNKMACLVILTCSIIMSNSFVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANIDCSE	60
VanDamme	MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCSIIMSNSLVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANINCSE	60
Rabinkov	-----MICLVILTCSIIMSNSFVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANINCSE	47
	* *****:*****:***	
Al+TS2#3	HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGC SADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV	120
VanDamme	HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGC SADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV	120
Rabinkov	HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGC SADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV	107
	*****	
Al+TS2#3	LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS	180
VanDamme	LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS	180
Rabinkov	LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS	167
	*****	
Al+TS2#3	LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFDKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV	240
VanDamme	LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFNKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV	240
Rabinkov	LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFDKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV	227
	*****:*****	
Al+TS2#3	TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW	300
VanDamme	TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW	300
Rabinkov	TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW	287
	*****	
Al+TS2#3	ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL	360
VanDamme	ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL	360
Rabinkov	ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEIVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL	347
	*****:*****	
Al+TS2#3	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN	420
VanDamme	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN	420
Rabinkov	RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVNCEWEEDKDCYQTFQN	407
	*****:*****	
Al+TS2#3	GRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFTDQTETA	480
VanDamme	GRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFIDQTETA	480
Rabinkov	GRINTQSGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFTDETETA	467
	*****.*****:*****	
Al+TS2#3	SRRPFI-LQNH-	490
VanDamme	SRRPFI-----	486
Rabinkov	SRRPFI-----	473
	*****	

**cDNA-Sequenz**

```

Al+TS2#12      ATGGTGGAGTCTTACAAAAAATTGGCAGTTGTAATAAAATGCCATGCCTAGTGATTTTG 60
VanDamme      ATGGTGGAGTCTTACAAAAAATTGGCAGTTGTAATAAAATGCCATGCCTAGTGATTTTG 60
Rabinkov      -----ATGATCTGCCTAGTGATTTTG 21
                ***      *****

Al+TS2#12      ACATGCATTATCATGTCTAATTCACCTTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 120
VanDamme      ACATGCATTATCATGTCTAATTCACCTTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 120
Rabinkov      ACATGCATTATCATGTCTAATTCATTTGTTAACAATAATAATATGGTTCAAGCGAAGATG 81
                *****

Al+TS2#12      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTTCAGAG 180
VanDamme      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTTCAGAG 180
Rabinkov      ACATGGACTATGAAGGCAGCAGAAGAGGCAGAGGCGGTGGCTAATATAAACTGTTTCAGAG 141
                *****

Al+TS2#12      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 240
VanDamme      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 240
Rabinkov      CATGGAAGAGCTTTTCTGGATGGAATTATTTTCGGAGGGCTCTCCTAAATGCGAGTGCAAC 201
                *****

Al+TS2#12      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 300
VanDamme      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 300
Rabinkov      ACTTGCTACACCGTCCGGATTGCTCTGAAAAGATCCAAGTTGCTCTGCTGATGTTGCC 261
                *****

Al+TS2#12      AGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 360
VanDamme      AGCGGTGACGGACTGTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 360
Rabinkov      AGTGGTGACGGACTGTTTCTAGAGGAATACTGGAAGCAGCACAAGGAAGCCAGTGCAGTG 321
                ** *****

Al+TS2#12      CTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 420
VanDamme      CTGGTTTCACCATGGCACAGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 420
Rabinkov      CTGGTTTCACCATGGCACCGAATGAGCTACTTTTTCAACCCAGTCAGCAATTTTCATATCT 381
                *****

Al+TS2#12      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 480
VanDamme      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 480
Rabinkov      TTCGAGCTTGAAAAACAATTAAGAAGTACACGAGGTAGTGGGAAATGCTGCTGCAAAG 441
                *****

Al+TS2#12      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 540
VanDamme      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 540
Rabinkov      GACAGGTACATTGTGTTTGGAGTAGGGGTCACACTCACTCATCCATGGACTCGTCATCTCT 501
                *****

```

```

Al+TS2#12      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 600
VanDamme      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 600
Rabinkov      CTTTCACCAAATATGACTGCCACTCCCGACGCACCAGAATCTAAAGTTGTTGCTCATGCC 561
*****

Al+TS2#12      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTGTGG 660
VanDamme      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTAACAAGAAAGGATACGTGTGG 660
Rabinkov      CCTTTTTATCCGGTGTTTCAGAGAACAACAAAATATTTTGACAAGAAAGGATACGTGTGG 621
*****

Al+TS2#12      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 720
VanDamme      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 720
Rabinkov      GCCGGAAATGCAGCCAATTACGTGAACGTTTCAAACCCAGAGCAGTATATTGAGATGGTT 681
*****

Al+TS2#12      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 780
VanDamme      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 780
Rabinkov      ACTTCACCTAATAACCCCGAAGGTCTGCTTCGCCATGCAGTAATCAAGGGATGCAAATCC 741
*****

Al+TS2#12      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 840
VanDamme      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 840
Rabinkov      ATTTACGATATGGTTTACTACTGGCCTCATTACACCCCAATCAAGTACAAAGCCGATGAA 801
*****

Al+TS2#12      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 900
VanDamme      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 900
Rabinkov      GATATCTTGCTGTTTACAATGTCTAAATTCACTGGACACTCTGGTAGTCGATTTGGGTGG 861
*****

Al+TS2#12      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAACACG 960
VanDamme      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAACACA 960
Rabinkov      GCGTTGATAAAGGATGAATCTGTGTATAATAACTTGTGAATTACATGACAAAGAATACG 921
*****

Al+TS2#12      GAGGGCAGCCTCGTGAAACACAGCTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTAGCA 1020
VanDamme      GAGGGCAGCCTCGTGAAACACAACACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAAGTTGTAGCA 1020
Rabinkov      GAGGGCAGCCTCGTGAAACACAACACTACGATCGCTCAAAGTTCTAAAGGAATTTGTAGCA 981
*****

Al+TS2#12      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1080
VanDamme      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1080
Rabinkov      ATGGTGAAAACGCAGAAAGGCACCATGCGTGACCTCAACACATTCGGTTTTAAGAAACTA 1041
*****

```

```

Al+TS2#12      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1140
VanDamme      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTACTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1140
Rabinkov      AGGGAGAGATGGGTCAATATCACTGCACTGCTCGATCAGTCCGACAGATTCTCCTATCAA 1101
                *****

Al+TS2#12      AAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1200
VanDamme      GAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1200
Rabinkov      GAGCTTCCTCAAAGCGAATACTGCAATTACTTCAGAAGAATGAGACCTCCATCCCCATCT 1161
                *****

Al+TS2#12      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1260
VanDamme      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1260
Rabinkov      TATGCATGGGTGAAGTGTGAATGGGAAGAAGACAAAGATTGCTACCAGACATTTTCAAGAT 1221
                ***** ** *****

Al+TS2#12      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1320
VanDamme      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1320
Rabinkov      GGACGTATCAACACACAAAATGGAGTGGGTTTTGAAGCTAGCAGTCGTTACGTGCGTTTG 1281
                *****

Al+TS2#12      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1380
VanDamme      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1380
Rabinkov      AGTTTGATCAAGACACAGGATGATTTTGATCAACTCATGTACTATTTGAAGGATATGGTT 1341
                *****

Al+TS2#12      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACCTTTTCACTGATCAGACCGAGATGGCC 1440
VanDamme      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATCAAACAACCTTTTCACTGATCAGACCGAGACGGCC 1440
Rabinkov      AAAGCAAAGAGGAAGACTCCTCTCATAAAACAACCTTTTCACTGATGAGACCGAGACGGCC 1401
                *****

Al+TS2#12      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAACTGCAGAATCAC 1473
VanDamme      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAA----- 1461
Rabinkov      TCCCGTCGTCCTTTTCATTTAA----- 1422
                *****

```

**Aminosäure-Sequenz**

```

Al+TS2#12      MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCSIIMSNLNVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANINCSE 60
VanDamme      MVESYKKIGSCNKMPCLVILTCSIIMSNLNVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANINCSE 60
Rabinkov      -----MICLVILTCSIIMSNLNVNNNMVQAKMTWTMKAEEEEAEAVANINCSE 47
               * *****:*****

Al+TS2#12      HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV 120
VanDamme      HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV 120
Rabinkov      HGRAFLDGIISEGSPKCECNTCYTGPDCSEKIQGCSADVASGDGLFLEEYWKQHKEASAV 107
               *****

Al+TS2#12      LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS 180
VanDamme      LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS 180
Rabinkov      LVSPWHRMSYFFNPVSNFISFELEKTIKELHEVVGNAAKDRYIVFGVGTQLIHGLVIS 167
               *****

Al+TS2#12      LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFDKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV 240
VanDamme      LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFNKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV 240
Rabinkov      LSPNMTATPDAPESKVVAHAPFYPVFREQTKYFDKKG YVWAGNAANYVNVSNPEQYIEMV 227
               *****:*****

Al+TS2#12      TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW 300
VanDamme      TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW 300
Rabinkov      TSPNNPEGLLRHAVIKGCKSIYDMVYYWPHYTPIKYKADEDILLFTMSKFTGHSGSRFGW 287
               *****

Al+TS2#12      ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL 360
VanDamme      ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEVVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL 360
Rabinkov      ALIKDESVYNNLLNYMTKNTEGTPRETQLRSLKVLKEIVAMVKTQKGTMRDLNTFGFKKL 347
               *****:*****

Al+TS2#12      RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN 420
VanDamme      RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVKCEWEEDKDCYQTFQN 420
Rabinkov      RERWVNITALLDQSDRFSYQELPQSEYCNFRMRPPSPSYAWVNCEWEEDKDCYQTFQN 407
               *****:*****:*****

Al+TS2#12      GRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFTDQTEMA 480
VanDamme      GRINTQNGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFIDQTETA 480
Rabinkov      GRINTQSGVGF EASSRYVRLSLIKTQDDFDQLMYYLKDMVKAKRKTPLIKQLFTDETETA 467
               *****.*****:*****

Al+TS2#12      SRRPFI-LQNH 490
VanDamme      SRRPFI----- 486
Rabinkov      SRRPFI----- 473
               *****
    
```

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Reaktionsschema der Umsetzung von Alliin zu Allicin durch die Aktivität der Alliinase.....	4
Abb. 2:	Reaktionsschema der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion des Allicins .....	4
Abb. 3:	Lebenszyklus von <i>Phytophthora infestans</i> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom LABOR FÜR PHYTOPATHOLOGIE DER UNIVERSITÄT WAGENINGEN).....	7
Abb. 4:	Lebenszyklus von <i>Alternaria (solani)</i> (nach HADDERS, 2006).....	9
Abb. 5:	Auslöser für die Öffnung der Mitochondrienporenkomplexe und damit Induktion der Apoptose (nach COLLATZ, 2001) über den intrinsischen Signalweg.....	11
Abb. 6:	Schematische Übersicht über Apoptoseereignisse (nach COLLATZ, 2001) .....	12
Abb. 7:	Zusammenhang zwischen dem Reduktionspotential des Redox-Paares GSSG / 2GSH und dem physiologischen Status einer Zelle (nach SCHAFER & BUETTNER, 2001).....	13
Abb. 8:	Transportwege im Endomembransystem von Pflanzenzellen (nach SANDERFOOT & RAIKHEL, 2003)...	15
Abb. 9:	Modell des Protein-Transports zu den Vakuolen (nach JOLLIFFE et al., 2005).....	17
Abb. 10:	A: Versuchsplan des Freilandversuchs; B: Versuchsfläche zu Beginn des Versuchs; C: Behandlung der Versuchspflanzen mit Hilfe einer Rückenspritze mit Druckluft.....	45
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Reaktionen im Verlauf des Glutathion-Reduktase-Assays zur Ermittlung des Glutathion-Gehalts in Hefe-Zellen.....	50
Abb. 12:	Schematische Darstellung einer typischen Polymerase-Ketten-Reaktion .....	57
Abb. 13:	Reaktionsschema des $\alpha$ -Amylase-Assays.....	81
Abb. 14:	Diagramme der HPLC-Analyse von Knoblauchsafte .....	84
Abb. 15:	Kalibrations des Bioassays anhand von HPLC-Daten.....	85
Abb. 16:	Wirkung von verschiedenen Knoblauchsafteverdünnungen gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation) .....	88
Abb. 17:	Wirkung verschiedener Behandlungsmethoden mit Knoblauchsafte gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation) .....	89
Abb. 18:	Einfluss verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Wirksamkeit von Knoblauchsafte ( $70 \mu\text{g ml}^{-1}$ Allicin) gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation).....	91
Abb. 19:	Änderung der Wirksamkeit von Knoblauchsafte ( $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ Allicin) gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate im Verlauf von 10 Tagen .....	92
Abb. 20:	Einfluss der Größe des umgebenden Raumes auf die Wirksamkeit von Knoblauchsafte gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation) .....	93
Abb. 21:	Wirkung von verkapseltem Knoblauchsafte gegen <i>Phytophthora infestans</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation).....	96
Abb. 22:	Boniturstufen des Freilandversuchs.....	98
Abb. 23:	Wirkung von Knoblauchsafte gegen <i>P. infestans</i> an Kartoffel im Freilandversuch (8 Wochen nach 1. Behandlung).....	98
Abb. 24:	Wirkung von Knoblauchsafteverdünnungen mit verschiedenen Allicingehalten gegen <i>Alternaria solani</i> an Tomate (4 Tage nach Inokulation) .....	100
Abb. 25:	Mikroskopische Aufnahme der Erreger, mit denen die für Versuche verwendeten Karottensamen befallen waren.....	101

Abb. 26: Wirkung verschiedener Allicin-Konzentrationen und Behandlungsmethoden auf die Keimrate *Alternaria*-befallener Karottensamen..... 102

Abb. 27: Einfluss verschiedener Anzucht-Methoden auf die Keimrate behandelter und unbehandelter Karottensamen..... 104

Abb. 28: Untersuchung zur Einbindung der Behandlung von Karottensamen mit verdünntem Knoblauchsafte in ein praxisübliches „Seed-Priming“-Verfahren ..... 105

Abb. 29: Einfluss verschiedener Quellzeiten auf die Wirksamkeit von Knoblauchsafte bei der Samenbehandlung ..... 106

Abb. 30: Einfluss einer sechsmonatigen Lagerung bei 10°C auf die Anzahl gesunder Keimlinge von Karotten, die zuvor mit Knoblauchsafte behandelt wurden..... 107

Abb. 31: Einfluss von Knoblauchsafte auf den Zoosporenschlupf von *Phytophthora infestans* (in vitro) ..... 109

Abb. 32: Einfluss von Knoblauchsafte auf die Keimung von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* (in vitro) ..... 111

Abb. 33: Einfluss von Knoblauchsafte auf das Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* (in vitro)..... 112

Abb. 34: Einfluss von Knoblauchsafte auf die Keimrate und das Keimschlauchwachstum von Sporangien und encystierten Zoosporen von *P. infestans* auf Tomatenblättern (in vivo)..... 114

Abb. 35: Einfluss von DTT auf die Hemmwirkung von Knoblauchsafte gegenüber *E. coli*-Wachstum im Bioassay ..... 116

Abb. 36: Hefe-Zellen des Stammes RS453 unbehandelt, nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Knoblauch und anschließendem Caspase-Assay ..... 120

Abb. 37: Hefe-Zellen des Stammes SS330 unbehandelt, nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Knoblauchsafte bzw. reinem Allicin und anschließendem Caspase-Assay..... 121

Abb. 38: Plasmidkarten der pFL61-Vektoren, die das Alliinasegen mit (Al+TS2) und ohne (Al) Signalsequenz beinhalten und zur Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen des Stammes RS453 verwendet wurden 123

Abb. 39: Western Blot von Proteinextrakten aus transgenen Hefen zur Überprüfung der Alliinase-Produktion ..... 124

Abb. 40: Plasmidkarten der pCHF1-Vektoren, die das Alliinasegen mit (Al+TS2) und ohne (Al) Signalsequenz beinhalten und zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* verwendet wurden ..... 125

Abb. 41: PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und Alliinase-spezifischen Primern..... 128

Abb. 42: PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und GAPDH-spezifischen Primern..... 128

Abb. 43: Wiederholung der PCR mit genomischer DNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten..... 128

Abb. 44: RT-PCR mit RNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und Alliinase-spezifischen Primern ..... 130

Abb. 45: RT-PCR mit RNA aus homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten und GAPDH-spezifischen Primern ..... 130

Abb. 46: Northern Blot-Analyse von homozygoten *Arabidopsis*-Transformanten ..... 131

Abb. 47: Gelfotos der Arbeitsschritte zur Klärung der Entstehung von zusätzlichen Banden in der RT-PCR mit RNA transgener *Arabidopsis*-Pflanzen..... 133

Abb. 48:	Alliinase-Sequenz (cDNA).....	134
Abb. 49:	PCR mit gekürzter und ungekürzter Alliinase-Sequenz zur Klärung der positiven Northern Blot-Ergebnisse von Linien, die in der RT-PCR zu kleine Banden erbracht hatten.....	135
Abb. 50:	Alliinase-Aktivität in homozygoten Transformanten des Ökotyps „Columbia“ im Vergleich zum Wildtyp und einer Linie, welche nach RNA-Analyse keine Alliinase-Expression zeigte .....	136
Abb. 51:	Alliinase-Aktivität in homozygoten Transformanten des Ökotyps „Landsberg erecta“ im Vergleich zum Wildtyp und zwei Linien, welche nach RNA-Analyse keine Alliinase-Expression zeigten .....	137
Abb. 52:	Plasmidkarten der pAMY-Vektoren, die für Lokalisationsstudien in Tabak-Protoplasten transformiert wurden.....	139
Abb. 53:	$\alpha$ -Amylase-Sekretion in Tabak-Protoplasten nach Zugabe von 33 $\mu$ M Wortmannin nach der Transformation bzw. bei Co-Transformation mit einem Konstrukt des vakuolären Sorting-Rezeptors BP80, dessen Ligandenbindestelle durch GFP ersetzt wurde (BP80-GFP) .....	141
Abb. 54:	$\alpha$ -Amylase-Sekretion in Tabak-Protoplasten bei Co-Transformation mit verschiedenen Mengen eines BP80-Konstrukts, bei dem die Ligandenbindestelle durch GFP ersetzt wurde (BP80-GFP).....	142
Abb. 55:	Plasmidkarte des pGFP-Vektors, der für Lokalisationsstudien in Tabak-Protoplasten transformiert wurde.....	143
Abb. 56:	Expression des fusionsfreien GFPs in Tabak-Protoplasten (pEMERALD) .....	143
Abb. 57:	Expression des an die Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelten GFP-Gens in Tabak-Protoplasten (pGFP+TS2).....	144
Abb. 58:	Expression des fusionsfreien GFP-Gens in Zwiebelepidermiszellen (pEMERALD).....	145
Abb. 59:	Expression des an die Signalsequenz der Knoblauch-Alliinase gekoppelten GFP-Gens in Zwiebelepidermiszellen (pGFP+TS2).....	145

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Verwendete Restriktionsendonukleasen.....	27
Tab. 2:	Verwendete Plasmide .....	30
Tab. 3:	Verwendete Oligonukleotide.....	31
Tab. 4:	Gradient der HPLC zur Quantifizierung des Allicingehalts des Knoblauchsafte.....	41
Tab. 5:	Klassifizierung der Phytotoxizität von Pflanzenschutzmitteln nach EWRC (siehe GOROG NEE PRIVITZER et al., 1988).....	47
Tab. 6:	Information über Vektorkonstruktionen für die Expression des Alliinasegens in Fremdorganismen und zur Alliinase-Lokalisation .....	71
Tab. 7:	Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-Page (ausreichend für 2 Gele bei einer Dicke von je 1 mm).....	78
Tab. 8:	Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-Page (ausreichend für min. 2 Gele bei einer Dicke von je 1 mm).....	78
Tab. 9:	Bewertung der pflanzenschädigenden Wirkung von Knoblauchsaft.....	95
Tab. 10:	Ergebnisse der Glutathion-Messungen in unbehandelten und mit Knoblauchsaft behandelten Hefe-Zellen (RS453).....	119
Tab. 11:	Verteilung selektierter T1-Pflanzen.....	126
Tab. 12:	Verteilung selektierter T2-Pflanzen.....	126
Tab. 13:	Verteilung selektierter T3-Pflanzen (Homozygote) .....	126
Tab. 14:	Nummerierung der homozygoten Arabidopsis-Linien (Alliinase-Transformanten) für molekularbiologische Analysen.....	127
Tab. 15:	Zusammenfassung der Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen homozygoter Alliinase-Transformanten ( <i>A. thaliana</i> ).....	132
Tab. 16:	Aktivitäten der $\alpha$ -Amylase im Medium und in Tabak-Protoplasten nach Transformation mit Konstrukten, welche die reine $\alpha$ -Amylase-Sequenz bzw. eine an verschiedene mögliche Signalsequenzgekoppelte $\alpha$ -Amylase-Sequenz enthielten .....	139

## DANKSAGUNG

**Herrn Prof. Alan J. Slusarenko** danke ich vielmals für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen anzufertigen, seine Bereitschaft zu ausführlichen Diskussionen und die Anleitung zu selbstständigem und eigenverantwortlichem Arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich **Herrn Dr. Ulrich Schaffrath** sowohl für die Übernahme des Koreferates aussprechen, als auch für die stetige Bereitschaft mich bei Problemlösungen zu unterstützen und mich in die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie einzuweisen.

Ich möchte mich bei allen derzeitigen und ehemaligen **Mitarbeitern** des Institutes für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen für ihre stete Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt **Clarissa, Gudrun, Hedi, Jürgen, Nina** und **Ulrike** für ihre tatkräftige Unterstützung, aber vor allem für das freundschaftliche Verhältnis, die immer währende Diskussionsbereitschaft, die manchmal notwendigen aufbauenden Worte und den Spaß, den wir zusammen in den vergangenen dreieinhalb Jahren hatten.

Ein großes Dankeschön geht an **Herrn Prof. J. Denecke** und seine **Mitarbeiter** an der Universität in Leeds (UK) für die enorme praktische und fachliche Unterstützung bei den Studien zur Lokalisation der Alliinase und die Möglichkeit einen Großteil der praktischen Arbeiten im Labor von Prof. J. Denecke durchzuführen. Ich habe sehr viel von ihnen gelernt.

Herzlich danken möchte ich auch **Michael Stitz** für die hervorragende Durchführung der Versuche zum Einfluss des Knoblauchs auf das Reduktionspotential von Glutathion in Hefe-Zellen während seines Forschungsblocks und für die gute und äußerst angenehme Zusammenarbeit.

Bei **Herrn Dr. A. Patel** bedanke ich mich für die Herstellung der Knoblauchsft-Kapseln und die gute und erfolgreiche Kooperation.

**Prof. C. Jacob, Prof. M. Keusgen, Dr. E. Koch, Dr. U. Steiner-Stenzel, Silke Vestweber, Julia Vogel, Dr. U. Wachendorff-Neumann** und **Sigrid Werner** danke ich für das Zurverfügung-Stellen von Arbeitsmaterial und Protokollen.

---

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen **Freunden, (Mit)Tänzern** und den **Kollegen bei Bayer CropScience** für das mir entgegen gebrachte Verständnis und ihre Unterstützung.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an **meine Familie**, die nicht nur in den Monaten des Zusammenschreibens viel ertragen musste und trotzdem nie müde geworden ist mir zuzuhören, mich zu beraten, aufzumuntern und anzuspornen. Vielen Dank auch für die tatkräftige Unterstützung.

## LEBENS LAUF

Name: Daniela Portz  
Adresse: Nikolausstr. 27  
52391 Vettweiß  
Geburtsdatum: 30. Mai 1978  
Geburtsort: Bonn - Bad Godesberg

### Schul Ausbildung

1984-1988 Grundschule Kelz  
1988-1997 Gymnasium, Städt. Rurtal-Gymnasium Düren  
1997 Abitur

### Hochschul Ausbildung

1997-2003 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
2003 Diplom in Biologie (Hauptfach: Botanik, Nebenfächer: Genetik, Mikrobiologie und Chemie)

### Praktika

1997 und 2000 Praktikum in der Abteilung "Biological Research Fungicides", BAYER AG  
1998 – 2000 Werkstudentenin in der Abteilung "Biological Research Fungicides", BAYER AG  
1998 – 2001 Student. Hilfskrafttätigkeit am Institut für Obst- und Gartenbau und Institut für Pflanzenkrankheiten, UNIVERSITÄT BONN  
2001 Praktikum in der Abteilung für Biotechnologie, BASF AG  
2001 Auslandspraktikum in der Abteilung „Agronomic Development“, BAYER HISPANIA S.A., Spanien  
2006 Praktikum in der Abteilung "Research Insect Control", SYNGENTA CROP PROTECTION MÜNCHWILEN AG, Schweiz

### Berufstätigkeit

2003 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Entwicklungsbiologie, UNIVERSITÄT KÖLN  
2003/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pflanzenkrankheiten, UNIVERSITÄT BONN  
2004 - 2007 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pflanzenphysiologie, RWTH AACHEN  
Seit Okt. 2007 Leitende Mitarbeiterin in der Abteilung „Biological Research Fungicides“, BAYER CROPSCIENCE AG